
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)**

**ORGANIZAÇÃO DE DNAs SATÉLITES NO GENOMA DO GAFANHOTO
ABRACRIS FLAVOLINEATA COM ÊNFASE NOS CROMOSSOMOS
SUPRANUMERÁRIOS: UMA ABORDAGEM ESTRUTURAL, FUNCIONAL
E EVOLUTIVA**

DIOGO MILANI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Março – 2017

DIOGO MILANI

ORGANIZAÇÃO DE DNAS SATÉLITES NO GENOMA DO GAFANHOTO *Abracris flavolineata* COM ÊNFASE NOS CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS: UMA ABORDAGEM ESTRUTURAL, FUNCIONAL E EVOLUTIVA

Orientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2017

595.7 Milani, Diogo
M637o Organização de DNAs satélites no genoma do gafanhoto
Aabraxis flavolineata com ênfase nos cromossomos
supranumerários: uma abordagem estrutural, funcional e
evolutiva / Diogo Milani. - Rio Claro, 2017
77 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

1. Inseto. 2. Citogenética de insetos. 3. Cromossomo B. 4.
DNA repetitivo. 5. Organização genômica. 6. Repetição em
tandem. 7. Transcrição. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **ORGANIZAÇÃO DE DNAS SATÉLITES NO GENOMA DO GAFANHOTO *Abracris flavolineata* COM ÊNFASE NOS CROMOSSOMOS SUPRANUMERÁRIOS: UMA ABORDAGEM ESTRUTURAL, FUNCIONAL E EVOLUTIVA**

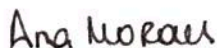
AUTOR: DIOGO MILANI

ORIENTADOR: DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO

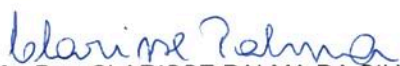
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Profa. Dra. ANA PAULA DE MORAES
Universidade Federal de São Paulo / Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. CLARISSE PALMA DA SILVA
Departamento de Ecologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 02 de março de 2017

Dedico este trabalho aos meus queridos pais João Augusto e Fátima, e aos meus irmãos Danilo e Mateus que sempre apoiaram minhas escolhas e estiveram presentes nos desafios e conquistas da vida.

Agradecimentos

Aos meus pais, João Augusto e Fátima, que sempre estiveram presentes em minha vida mostrando carinho, amor, compreensão, humildade e como vencer os obstáculos da vida e se tornar uma pessoa melhor. Ao meu irmão gêmeo Danilo que compartilhou comigo todas as etapas da vida, desde nossa formação de diminutos embriões para minúsculos fetos e assim para pequenos bebês, permanecendo como meu eterno companheiro para todas as horas, minutos e instantes, jamais me deixando em qualquer sombra de solidão. Meu querido irmão biólogo Mateus, que sempre me aconselhou e serviu como exemplo de pessoa, coragem e profissionalismo.

Agradeço profundamente ao meu orientador Professor Doutor e amigo Diogo Cavalcanti Cabral de Mello, pelo incentivo e confiança em meu trabalho, sempre se mostrando de prontidão para resolução de problemas e barreiras não somente em nossa pesquisa, mas também para os desafios do dia a dia. Acima de tudo agradeço por nossa amizade e por sempre se mostrar como um exemplo extraordinário de orientador, professor, pesquisador, conselheiro e pai.

A todos os amigos do laboratório de citogenética, pelas conquistas, comemorações, conversas, risadas e que sempre me auxiliaram no desenvolvimento de novos experimentos e conhecimento. Octávio, Thiago (e Passion), Vavá, Allison, Mariani, Ana Beatriz, Nahanna, Lays, Leo, Ana Elisa, Rafael, Kety, Flávia, Carol e Prof^a Patrícia.

Aos meus amigos de infância Alexandre, Luís Japonês, Louiz, e especialmente Lucas que me incentivou e encorajou para que eu enfrentasse e alcançasse meus objetivos.

A Viviane Lopes, minha companheira, por aceitar-me como sou e por todos os ensinamentos, conselhos, alegria, carinho e amor durante todos esses anos.

Por fim, agradeço à FAPESP pela bolsa de estudos com número de processo 2015/05246-3, ao Departamento de biologia e ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UNESP de Rio Claro/SP, e pela bolsa Capes atribuída nos primeiros meses de pesquisa.

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsible to change” – Charles Darwin

RESUMO

DNAs satélites (DNAsat) são sequências usualmente repetidas centenas a milhares de vezes arranjadas consecutivamente uma à outra, enriquecidas geralmente na heterocromatina em regiões específicas ou cromossomos, tais como os cromossomos B. Neste trabalho, isolamos o primeiro DNAsat no gafanhoto *Abracris flavolineata*, nomeado AflaSAT-1. A sequência foi caracterizada integrando abordagem molecular, genômica e citogenética objetivando compreender a organização estrutural, evolução nos cromossomos A e B e possível atividade transcricional. O AflaSAT-1 é compartilhado entre espécies de gafanhotos, mas revelou uma evidente amplificação em *A. flavolineata* formando arranjos detectáveis. A sequência apresentou baixa variabilidade em nível interpopulacional; no entanto monômeros do cromossomo B (μ B-DNA) da população de Rio Claro/SP exibiram maior variabilidade e quatro mutações exclusivas, refletindo a comum taxa mutacional mais elevada dos cromossomos B. A análise genômica estrutural revelou organizações distintas para o DNAsat, apresentando uma associação alternativa com outro DNAsat, nomeado AflaSAT-2. A análise cromossômica revelou que ambos os DNAsat estão interligados um ao outro formando grandes blocos nos centrômeros de quase todos os cromossomos (exceto para o menor par), e para o cromossomo B apenas um pequeno sinal centromérico foi notado em indivíduos da população de Rio Claro/SP. Nas distintas populações a distribuição cromossômica do AflaSAT-1 revelou variabilidade, como ausência de algumas marcas, blocos adicionais e também heteromorfismo, a qual se correlacionou com a estimativa de número de cópias, sugerindo uma dinâmica de expansão ou eliminação de repetições. Finalmente, a constitutiva atividade transcricional de AflaSAT-1 foi observada nos distintos tecidos de adultos, e em distintas fases de desenvolvimento, tanto em indivíduos portadores e não portadores de cromossomo B.

Palavras chave: cromossomo B, DNA repetitivo, organização genômica, repetição em tandem, transcrição

ABSTRACT

Satellite DNAs (satDNA) are sequences usually repeated hundred to thousand times tandemly arrayed, enriched in heterochromatin from specific region or chromosomes, including B chromosomes. Here, we isolated the first satDNA in the grasshopper *Abracris flavolineata*, named AflaSAT-1. The sequence was characterized by integration of cytogenetic, molecular and genomics approaches, aiming to understand the structural organization, evolution in A and B chromosomes and possible transcriptional activity. The AflaSAT-1 is shared with other grasshopper species, but it was evidently amplified in *A. flavolineata* forming detectable clustered arrays. AflaSAT-1 presented low variability at interpopulational level; but monomers from B chromosome observed in individuals from Rio Claro/SP were more variable presenting four exclusive mutations, reflecting the common higher mutational rate in this chromosome. Genomic structural analysis revealed distinct organization for the satDNA, with its alternative association with other satDNA, named AflaSAT-2. The chromosomal analysis showed that both satDNAs were also interglimed to each other, forming large blocks in centromeres of almost all chromosomes (except the smallest pair), but in the B chromosome only a small centromeric signal was noticed in individuals from Rio Claro/SP. Chromosomal distribution for AflaSAT-1 revealed variability, at populational level, with absence of marks, additional clusters and heteromorphism. This variation was coincidentally followed by variability in copy number, suggesting dynamic expansion or elimination of repeats. Finally, AflaSAT-1 was constitutively transcriptionally active in five tissues of adults, in distinct life cycle phases, and both in carrier and non-B chromosome carriers.

Key-words: B chromosome, repetitive DNA, genome organization, tandem repeat, transcription

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 DNAs satélites: características gerais.....	6
1.2 DNAs repetitivos e sua relação com cromossomos B em gafanhotos	8
2. OBJETIVOS E METAS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos e metas específicas	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Material biológico e obtenção de cromossomos	15
3.2 Isolamento de sequências repetitivas por digestão enzimática	15
3.3 Clonagem, sequenciamento e construção de primers	15
3.4 Amplificação por PCR do AflaSAT-1 e análise das sequências	16
3.5 Análise do DNA satélite a partir de dados de sequenciamento genômico	16
3.6 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) e hibridização em membrana (Dot Blot)	17
3.7 PCR em tempo real para número de cópias	18
3.8 Extração de RNA e PCR de Transcriptase reversa	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Capítulo 1: Uncovering the evolutionary history of a satellite DNA in the genome of the grasshopper <i>Abracris flavolineata</i>	21
5. CONCLUSÕES FINAIS	64
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. DNAs satélites: características gerais

O genoma nuclear dos eucariotos está organizado basicamente em sequências de cópia simples e DNAs repetitivos, para os quais análises estruturais e funcionais continuam sendo um foco bastante abordado (BISCOTTI et al. 2015a; b; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012). Os DNAs repetitivos representam famílias de diferentes classes, com variável grau de repetição que estão organizadas em tandem ou dispersas pelo genoma. Dentre os elementos repetitivos em tandem estão incluídos basicamente as famílias multigênicas, os DNAs satélites (DNAsat, minissatélites e microssatélites) e os elementos de transposição (transposons e retrotransposons), que podem também ser dispersos (CHARLESWORTH et al. 1994; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012). Dentre todas as classes de DNAs repetitivos, os DNAsat têm despertado atenção em pesquisas relacionadas à evolução genômica, ao mapeamento e diferenciação cromossômica e à funcionalidade em diferentes grupos de eucariontes em especial após a maior disponibilidade de técnicas de genômica (CAZAUX et al. 2013; GARCÍA et al. 2015; HEITKAM et al. 2015; KOPECNA et al. 2014; KUHN 2015; MACAS et al. 2010; NERGADZE et al. 2014; PALOMEQUE e LORITE 2008; PEZER et al. 2011; RUIZ-RUANO et al. 2016; VITTORAZZI et al. 2014).

Os DNAsat são sequências altamente repetitivas com ampla variabilidade estrutural e quantidade de repetições nos genomas dos eucariotos, representando quase 50% dos genomas de alguns insetos e roedores, chegando a mais de 20% do genoma nuclear de plantas e menos de 5% em humanos (LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012). As famílias de DNAsat estão predominantemente acumuladas em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, podendo variar entre poucas até milhares de cópias, apresentando tamanhos de 5 pb até mais de 1.000 pb (CHARLESWORTH et al. 1994; RUIZ-RUANO et al. 2016). Muitos estudos têm demonstrado que os DNAsat além de serem necessários para organização cromossômica, também desempenham um papel no pareamento e segregação. Além disso, alguns DNAsat que apresentam atividade transcricional podem participar na regulação e formação da heterocromatina, como também na modulação de expressão gênica (BRAJKOVIĆ et al. 2012; CAMACHO et al. 2015; FELICIELLO et al. 2015; KUHN 2015; PEZER et al. 2011; PLOHL et al. 2008; TOPP et al. 2004; TSOUMANI et al. 2013; UGARKOVIĆ 2005).

Famílias de DNAsat são muito abundantes em determinados genomas e a sua composição e o número de famílias não relacionadas podem variar muito, sendo isto resultado de mecanismos de mutação seguido de evolução em concerto (CHARLESWORTH et al.

1994; PALOMEQUE e LORITE 2008; PLOHL et al. 2008; UGARKOVIĆ e PLOHL 2002) que conduzem ao surgimento e fixação de sequências de DNAsat espécie específicas. Por outro lado, algumas sequências de DNAsat podem ser conservadas em distintos níveis, tais como populacionalmente ou em espécies filogeneticamente distantes. Como exemplo desta conservação, estudos populacionais com *Drosophila* comprovaram altos níveis de homogeneidade entre sequências intraespecíficas (KUHN et al. 2003; KUHN e SENE 2005) e diversas sequências de DNAsat confirmaram ser altamente conservada dentre alguns grupos de vertebrados (CAZAUX et al. 2013; KOPECNA et al. 2014; PAÇO et al. 2015; VITTORAZZI et al. 2014).

Segundo Dover (1986), os DNAs satélites representam uma porção do genoma eucarioto que se modifica por processos estocásticos direcionados pelas interações moleculares providas pelos mecanismos de recombinação que proporcionam altas taxas de mutações. No entanto, outros estudos indicam que a evolução das sequências de DNAsat são influenciadas por pressões seletivas devido a suas interações com proteínas específicas necessárias para formação da heterocromatina e controle de expressão gênica atuando como RNA de interferência (HALL et al. 2003; MRAVINAC et al. 2005).

Um dos modelos evolutivos de DNAsat mais aceito é o modelo de “biblioteca de DNA satélites” em que os DNAsat são estocados preferencialmente na região centromérica. Neste modelo, espécies de plantas e animais filogeneticamente relacionadas compartilham famílias de DNAsat, que são amplificadas de forma diferencial ao longo da diversificação das linhagens (BRUVO-MADARIĆ et al. 2007; CESARI et al. 2003; FRY e SALSER 1977; LIN et al. 2006; KAWABE e CHARLESWORTH 2007; MEŠTROVIĆ et al. 2006; UGARKOVIĆ et al. 2008; VERSHININ et al. 1996). O modo de evolução e a alta taxa de conservação de alguns DNAsat, além da sua expressão tecido-específica em várias espécies, fortalecem também a hipótese de que esses elementos de DNA podem ter um papel regulatório na modulação da cromatina e controle de expressão gênica em organismos eucarióticos (UGARKOVIĆ 2005). A exemplo disso, em *Bactrocera oleae*, popularmente conhecida como mosca-da-azeitona, foi confirmada a transcrição de um DNAsat centromérico em ambos os sexos (TSOUMANI et al. 2013). Um outro estudo realizado com ratos relata que DNAsat pericentroméricos passam por um pico transiente de expressão precisamente no momento da formação cromocentro, mostrando evidências de que essas sequências podem apresentar um nível de expressão diferencial em distintos estágios do desenvolvimento do indivíduo (PROBST et al. 2010). No besouro *Tribolium castaneum* um único DNAsat representa 35% do genoma e se apresenta transcricionalmente ativo e

provavelmente com funções de modulação da expressão gênica junto com a eucromatina (BRAJKOVIĆ et al. 2012). Além disso, outros transcritos de DNAsat demonstram evidências de suas atividades relacionadas com o funcionamento de centrômeros e heterocromatina em insetos (PEZER et al. 2011; UGARKOVIĆ 2009).

1.2. DNAs repetitivos e sua relação com cromossomos B em gafanhotos

Os cromossomos B ou supernumerários foram os primeiros elementos egoístas descritos (WILSON 1907) e definidos por Jones e Rees (1982) como cromossomos não homólogos aos cromossomos do complemento A, por não apresentarem capacidade de recombinação com os mesmos.

Esses elementos presentes em alguns indivíduos de algumas populações de diversas espécies de eucariotos foram definidos como elementos dispensáveis por sua presença, na maioria dos casos, não conferir nenhuma vantagem aos seus hospedeiros e o desenvolvimento dos indivíduos ocorrem normalmente na ausência de cromossomos B (CAMACHO et al. 2000). No entanto, para algumas espécies já foi registrada influência direta da presença de cromossomos B, como no caso de *Allium schoenoprasum* em que as plantas com cromossomos B sobrevivem mais do que as plantas sem B em ambiente natural. Sobretudo para esta espécie de alho, o modelo de evolução de cromossomos B mais compatível é o modelo heterótico que propõe um equilíbrio de acordo com o número de cromossomos B presentes que confere efeitos positivos (sem acumulação) e negativos (quando em alto número) (HOLMES e BOUGOURD 1989). Diferentemente, o modelo parasítico, ou egoísta, ocorre na maioria dos casos estudados (CAMACHO et al. 2000) e tem como preceito o balanço entre os resultados da ação de sua acumulação e efeitos negativos ou positivos nos seus hospedeiros (JONES 1985; SHAW e HWITT 1990).

A origem dos cromossomos B é atribuída aos cromossomos do complemento A, podendo surgir do próprio genoma hospedeiro (intraespecificamente) ou a partir do processo de hibridização de distintas espécies (interespecificamente) (CAMACHO 2005).

Por esses cromossomos não recombinarem com o complemento A, podem estar em diferentes números em diferentes indivíduos de uma determinada população. Os cromossomos B seguem seu próprio caminho evolutivo, como por exemplo através da acumulação de mutações exclusivas e ocorrência de distintas sequências (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO 2005; HOUBEN et al. 2014; VALENTE et al. 2016; TRIFONOV et al. 2013), e se acumulam graças aos mecanismos de acumulação, mitóticos e/ou meióticos, devido a segregação não mendeliana e os mesmos se transmitirem com taxas superiores das

dos cromossomos A (HOUBEN et al. 2014; JONES 1995). Um dos exemplos mais extremos de acúmulo de cromossomos B é o caso de *Zea mays* ($2n = 20 \text{ As} + 0\text{--}34 \text{ Bs}$) gerando efeitos sobre o fenótipo externo, como o desenvolvimento de folhas listradas (HOUBEN et al. 2014). Além da variação de número, os cromossomos B também apresentam distintos tamanhos e morfologia que podem interferir diretamente em sua estabilidade ao longo das divisões celulares, sendo os medianos-grandes os mais estáveis (CAMACHO 2005).

Desde a descoberta dos cromossomos B, esses já foram relatados em cerca de 15% das espécies de eucariotos, encontrados mais frequentemente em ortópteros, peixes, gramíneas e espécies da família Liliácea (CAMACHO 2005). Este viés de observação de cromossomos B em alguns grupos pode estar relacionado ao maior número de espécies estudadas ou a maior facilidade de análises cromossômicas. Segundo Palestis et al. (2010), em ortópteros foram contabilizados a presença de cromossomos B em cerca de 190 espécies com uma maior prevalência para a superfamília Acridoidea.

Um padrão bastante comum reportado para os cromossomos Bs é sua natureza heterocromática e a ocorrência de DNAs repetitivos (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO 2005; GREEN et al. 1993; HOUBEN et al. 2014; JONES et al. 2008), embora alguns genes de cópia única também tenham sido descritos (GRAPHODATSKY et al. 2005; HOUBEN et al. 2014; MAKUNIN et al. 2014; TRIFONOV et al. 2013; VALENTE et al. 2014). Diversas classes de DNA repetitivos foram encontrados nos cromossomos B evidenciando a importância dessas sequências com destaque para os DNAsat, microsatélites, elementos transponíveis e famílias multigênicas, incluindo os DNAr 18S, 5S, DNAsn U2 e genes histonas (BUENO et al. 2013; CABRAL-DE-MELLO et al. 2010; CAMACHO 2005; FANTINATTI et al. 2011; LÓPEZ-LEÓN et al. 2008; LORETO et al. 2008; MESTRINER et al. 2000; MILANI et al. 2014; OLIVEIRA et al. 2011; PALACIOS-GIMENEZ et al. 2014; POLETTO et al. 2010; RUIZ-RUANO et al. 2015; SILVA et al. 2014; TERUEL et al. 2010; VICARI et al. 2011; ZIEGLER et al. 2003). Estes distintos DNAs repetitivos foram descritos em diversos cromossomos B de diferentes espécies, tais como *Eypepocrinemis plorans* (Orthoptera), *Crepis capillaris* (Asteraceae), *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera), *Drosophila subsilvestris* (Diptera), *Zea mays* (Poaceae), *Secale cereale* (Poaceae), *Astyanax scabripinnis* (Osteichthyes), dentre outros, podendo, os mesmos, serem específicos dos Bs ou compartilhados com cromossomos A (GUTKNECHT et al. 1995; HOUBEN et al. 2014; JAMILENA et al. 1994; LÓPEZ-LEÓN et al. 2008; MARQUES et al. 2012; NUR et al. 1988; PUERTAS 2002).

O acúmulo de elementos repetitivos nos cromossomos B está diretamente associado a sua natureza heterocromática e ausência de recombinação com os elementos A (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO et al. 2000). No entanto, a influência dos DNAs repetitivos para a formação dos cromossomos B sugere dois pontos de vista sobre a evolução desses elementos. O mais primordial dentre eles é que os cromossomos B tenderiam surgir com tamanho grande sofrendo perda consecutiva de DNA, tendo seus genes degenerados e silenciados, por invasão de elementos repetitivos, minimizando os efeitos fenotípicos da presença do B (GREEN 1990). O outro ponto de vista sugere que os cromossomos B são diminutos e aumentam a partir da sucessiva amplificação ou *crossing-over* desigual de sequências repetitivas compartilhadas com o genoma A. Essas sequências repetitivas localizadas próximas ao centrômero poderiam trazer vantagens para a diferenciação dos cromossomos B, como alteração nas formas de impulso meiótico (meiotic drive) e taxas de não-disjunção (HENIKOFF e MALIK 2002). Em adição, os DNA repetitivos são um dos maiores contribuintes para o aumento do genoma dentre as espécies, possibilitando a maior capacidade de transferência de DNA para os cromossomos B em espécies com genomas maiores, como por exemplo os gafanhotos *Eypropecnemis plorans* e *Locusta migratoria*, apresentando 11.11 Gb e 6.3 Gb, respectivamente (RUIZ-RUANO et al. 2014).

Embora seja bastante frequente a presença de cromossomos B nos gafanhotos, enquanto que estudos em espécies sul-americanas são ainda bastante escassos, os estudos são mais concentrados nas espécies do velho mundo, tais como, *Eypropecnemis plorans* e *Locusta migratoria*. Em *E. plorans*, a espécie modelo mais bem estudada para análises de diversificação de cromossomos B, o uso de sequências repetitivas de DNA tem sido bastante útil em análises da origem e diversificação das distintas variantes destes elementos. Nos indivíduos portadores de cromossomos B, este elemento está presente em todos os tecidos (RUÍZ-ESTÉVEZ et al. 2014). O mapeamento físico cromossômico utilizando diversos tipos de DNAs repetitivos como, por exemplo, os genes ribossomais (18S, 5S e 45S) e sequências de DNAsat (180-bp) (CABRERO et al. 2003; 2014; LÓPEZ-LEÓN et al. 1994; TERUEL et al. 2013), elementos de transposição dos tipos *Gypsy*, *RTE*, *Mariner* e um retrotransposon *R2* (MONTIEL et al. 2012; 2014), auxiliaram a traçar a origem destes elementos nas populações desta espécie, evidenciando a presença de mais de 50 variantes de cromossomos B em distintas populações de *E. plorans* (BAKKALI et al. 1999; 2002; LÓPEZ-LEÓN et al. 2008).

Segundo Teruel et al. (2009a) a pintura cromossômica com sondas totais obtidas dos cromossomos B24 e X indicaram forte relação de compartilhamento de sequências entre estes cromossomos, além do compartilhamento de sequências com os blocos de heterocromatina

autossômicos, indicando uma provável origem intraespecífica deste elemento. Além disso, outros estudos foram realizados a fim de obter informações sobre a funcionalidade de genes ribossomais e expressão de proteínas na presença do cromossomo B (CABRERO et al. 2013; RUÍZ-ESTÉVEZ et al. 2013; 2014; TERUEL et al. 2011).

Outro exemplo de gafanhoto já bastante estudado é a espécie *Locusta migratoria*. Dentre as diversas análises realizadas com esta espécie, a microdissecção dos cromossomos B e X foi realizada obtendo um resultado similar ao obtido em *E. plorans* (TERUEL et al. 2009b). O mapeamento físico cromossômico de DNAs repetitivos realizado nesta espécie demonstrou que alternativamente aos genes de DNAr, os genes de histonas H3 e H4 mostraram-se presente nos cromossomos B (TERUEL et al. 2010), sugerindo a origem deste elemento a partir do par cromossômico 8 da espécie, também portador do cluster de histona.

Dentre as espécie sul-americanas melhor estudadas em relação a composição do cromossomo B estão por exemplo, *Rhammatocerus brasiliensis*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Dichroplus pratensis*, *Eumastusia koebelei koebelei* e *Abracris flavolineata* (ANJOS et al. 2016; BIDAU et al. 2004; BUENO et al. 2013; LORETO et al. 2008). Em *R. brasiliensis*, estudos de cromossomo B revelaram semelhança com alguns autossomos portadores de DNAr 5S mas não DNAr 45S, e também mostraram que o cromossomo X não apresenta famílias de DNAr (LORETO et al. 2008), indicando origem autossômica do cromossomo B. Por outro lado, o DNAr 5S mapeado em todos os cromossomos do complemento A (exceto no par 11) e no cromossomo B, mostrou um resultado distinto em outras populações analisadas. Além do espalhamento do DNAr 5S no genoma de *R. brasiliensis* foram também observados múltiplos sítios de genes de histonas H3, localizados nas mesmas regiões cromossômicas de DNAr 5S, também no cromossomo B (OLIVEIRA et al. 2011). Em *X. d. angulatus*, o cromossomo B não apresentou DNAr 45S, ao passo que o cromossomo X apresentou um dos dois clusters de DNAr 45S do genoma (LORETO et al. 2008), reforçando origem autossômica deste elemento. Na espécie de gafanhoto *Dichroplus pratensis* três tipos distintos de cromossomos B foram relatados (BIDAU 1987), dos quais um deles apresentou sítios de DNAs ribossomais compartilhado com o par cromossômico 8 localizados em uma região muito próxima, sugerindo ancestralidade (BIDAU et al. 2004). Em *Eumastusia koebelei koebelei*, a origem intraespecífica dos cromossomos B foi também sugerida devido ao compartilhamentodos sinais de hibridização de sequências repetitivas obtidas do genoma A através da técnica da DOP-PCR (ANJOS et al. 2016).

Abracris flavolineata é a espécie sul-americana com distribuição neotropical melhor caracterizada para o polimorfismo de cromossomos B. Esta espécie apresenta o cariótipo $2n =$

23, X0 (machos) e $2n = 24$, XX (fêmeas) com alguns indivíduos da população de Rio Claro/SP portadores de 1-2 cromossomos B submetacêntricos totalmente C-negativos (BUENO et al. 2013). A estimativa mais atual de frequência de cromossomos B para os indivíduos de Rio Claro/SP é de 24.5% para as fêmeas e 13.5% para os machos (MILANI et al. 2017), demonstrando uma alteração de frequência em relação aos números publicados por Bueno et al. (2013), de 29.7% para as fêmeas e 31.5% para os machos. Se por um lado a flutuação na frequência do cromossomo B entre os sexos nesta espécie, possa ser atribuída à deriva genética, por outro lado, essas estimativas devem ser confirmadas com estudos ao longo dos anos.

Em relação a composição do cromossomo B de *A. flavolineata* o conjunto de estudos indica a origem do cromossomo B a partir do par cromossômico 1 portador de sítios de DNAsn U2, que também ocorre em múltiplas cópias no B. A distribuição longitudinal dos quatro sítios de DNAsn U2 no cromossomo B de *A. flavolineata* sugere a origem deste elemento pela formação de um isocromossomo, seguido de amplificação de sequências que aumentou o tamanho de um dos braços (BUENO et al. 2013). Outras famílias gênicas, incluindo os DNAr, DNAsn U1 e genes de histona H3 não estão presentes no B (BUENO et al. 2013; MENEZES-DE-CARVALHO et al. 2015). Além do gene de DNAsn U2 o cromossomo B de *A. flavolineata* está enriquecido de dois elementos transponíveis similares a *Mariner*, um deles distribuído por todo o cromossomo e o outro concentrado no braço longo (PALACIOS-GIMENEZ et al. 2014), além de diversas repetições de microssatélites (MILANI e CABRAL-DE-MELLO 2014). A pintura cromossômica com o DNA de cromossomos B microdissectados de *A. flavolineata* revelou compartilhamento com regiões eucromáticas dos cromossomos A e sinais intensos nos dois braços do B, reforçando a hipótese de formação de isocromossomo e a possível presença de sequências eucromáticas neste cromossomo. Além disso, a baixa variabilidade do gene DNAsn U2 entre o genoma A e o cromossomo B, sugere que esse gene possa ser funcional neste elemento, além de que, a evolução em concerto esteja agindo nas repetições dos cromossomos do complemento A e B levando a homogeneização intracromossômica dessas sequências (MENEZES-DE-CARVALHO et al. 2015).

Até o momento, esses trabalhos realizados tem descrito informações necessárias para o entendimento da dinâmica, composição e evolução do cromossomo B de indivíduos da população de Rio Claro/SP, mostrando evidências sobre a sua origem e possível natureza eucromática (BUENO et al. 2013; MENEZES-DE-CARVALHO et al. 2015; MILANI e CABRAL-DE-MELLO 2014; PALACIOS-GIMENEZ et al. 2014). No entanto, muito pouco

se sabe sobre os outros tipos de DNAs repetitivos que este elemento abriga, como por exemplo os DNA satélites, e muito menos de como esses DNAs repetitivos influenciam a evolução do genoma hospedeiro.

2. OBJETIVOS E METAS

2.1. Objetivo geral

Compreender a estrutura, organização, padrões de evolução e possível transcrição de DNAs satélites no genoma de *Abracris flavolineata*, com ênfase nos cromossomos supranumerários.

2.2. Metas específicas

- Isolar por restrição enzimática, sequenciar e mapear através da FISH, os DNAs satélites obtidos do genoma de *A. flavolineata*, buscando os padrões de organização cromossômica e sua possível relação com os cromossomos B;
- Isolar através da PCR, caracterizar a sequência nucleotídica e mapear através da FISH DNAs satélites previamente identificados no genoma de *A. flavolineata* de distintas populações (ao menos quatro), buscando entender seus padrões evolutivos interpopulacionalmente e intrapopulacionalmente ;
- Utilizar o produto da microdissecção do cromossomo B de indivíduos da população de Rio Claro como molde para amplificação cromossomo-específica dos DNAs satélites isolados, buscando entender a diversificação destas sequências neste cromossomo em comparação ao complemento A;
- Buscar as repetições de DNA satélite no genoma de *A. flavolineata* a partir de dados de sequenciamento genômico completo, a fim de elucidar os padrões de organização e possível associação com outros elementos no genoma da espécie;
- Verificar a possível transcrição dos DNAs satélites isolados por rtPCR em diferentes tecidos, fases de desenvolvimento e na presença/ausência de cromossomo B a fim de obter dados sobre a funcionalidade destas sequências e seus padrões de transcrição;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico e obtenção de cromossomos

Espécimes machos e fêmeas adultos de *Abracris flavolineata* foram coletados em seis regiões do Brasil: (1) Rio Claro/SP (São Paulo), (2) Cabo/PE (Pernambuco), (3) Sta. Bárbara do Pará/PA (Pará), (4) Paranaíta/MT (Mato Grosso), (5) Manaus/AM (Amazonas) e (6) Posadas/Misiones (Argentina). Para obtenção de cromossomos de células meióticas, foram utilizados testículos de machos previamente fixados em solução etanol absoluto:ácido acético 3:1 armazenados à -20°C. Animais inteiros foram imersos em etanol absoluto e armazenados à -20 °C para posterior extração do DNA genômico (gDNA). Células mitóticas foram obtidas de embriões seguido pelo protocolo proposto por Webb et al. (1978). Os embriões foram obtidos a partir da dissecação do ovo com cerca de 15 dias após a postura de diversos indivíduos coletados de Rio Claro/SP alocados em caixas de criação. As lâminas foram obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento e coradas com Giemsa 5% para análises convencionais para conferir a presença de Bs nas distintas posturas dos indivíduos de Rio Claro/SP e analisar a estrutura cromossômica geral dos animais das diferentes populações.

3.2. Isolamento de sequências repetitivas por digestão enzimática

Os DNAs genômicos de exemplares das seis populações foram extraídos pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL 2001) e armazenado em freezer -20 °C. O DNA genômico dos indivíduos da população de Rio Claro/SP foram fragmentados por digestão enzimática utilizando 3 enzimas de restrição (*Hind*II, *Alu*I e *Sma*I). Os produtos digeridos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience, Brasil) para verificar e selecionar a reação que apresentou o padrão de “ladder”, típico para sequencias de DNA arranjadas em tandem. Subsequentemente o monômero fracionado do respectivo DNAsat foi selecionado e purificado pelo kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Resarch Corp., The Epigenetics Company, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.3. Clonagem, sequenciamento e construção de primers

Os produtos purificados obtidos por digestão enzimática do DNA de indivíduos de Rio Claro/SP foram clonados usando o kit pMOS*Blue* Blunt Ended Cloning (GE Healthcare) com as células competentes DH5α *Escherichia coli*. Diversas colônias positivas foram selecionadas e o inserto foi isolado por Reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os pares de primers universais M13 (F-5'GTAAAACGACGGCCAG e R-

5'CAGGAAACAGCTATGAC). O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de Sanger realizado pela companhia Macrogen Inc. (Korea). O programa Geneious v.4.8.5 (DRUMMOND et al. 2009) foi utilizado para checar a qualidade e excluir as sequências dos vetores de clonagem. Além disso, um par de primers específicos (F-5'GACAGTTTTAAACACTTCCATTACAG e R-5'GACTGTGTTGATATCCAATAACA) foi desenhado para amplificação por PCR da primeira sequência de DNAsat (AflaSAT-1).

3.4. Amplificação por PCR do AflaSAT-1 e análise das sequências

A amplificação por PCR do AflaSAT-1 foi conduzida utilizando como molde o DNA genômico de animais pertencentes de seis diferentes populações, e do cromossomo B previamente microdissectado (μ B-DNA) obtidos de indivíduos de Rio Claro/SP (MENEZES-DE-CARVALHO et al. 2015). As condições dos experimentos de PCR foram de 94°C por 5 minutos para a desnaturação seguido por 30 ciclos de 94°C (30s), 55°C (30s), 72 °C (80s), mais uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR resultantes foram visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience, Brasil), e as bandas foram isoladas e purificadas com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Para clonagem dos produtos de PCR purificados, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) com as células competentes DH5 α *Escherichia coli*. Os clones positivos foram isolados utilizando sistema “azul/branco” e o inserto amplificado com os primers universais M13 e sequenciados pela companhia Macrogen Inc. (Korea).

As sequências monômeros foram tratadas utilizando o Geneious v.4.8.5 (DRUMMOND et al. 2009) e posteriormente agrupadas para checar o polimorfismo de DNA e reconhecimento de haplótipos pela ferramenta DnaSP v.5.10.01 tool (LIBRADO e ROZAS 2009). Para uma análise mais minuciosa, as sequências “singletons” foram descartadas. Um gráfico de rede de haplótipos foi construído empregando o software Network 4.6.1.2 software (<http://www.fluxus-engineering.com>) e uma árvore de distancia (neighbor joining) foi gerada pelo programa MEGA6 (<http://www.megasoftware.net>). As sequências correspondentes aos haplótipos foram todas depositadas no banco de dados NCBI.

3.5. Análise do DNA satélite a partir de dados de sequenciamento genômico

As repetições do AflaSAT-1 foram procuradas no genoma sequenciado de *A. flavolineata* de um indivíduo portador de um cromossomo B. O genoma foi sequenciado

utilizando a plataforma Illumina Miseq paired-end (2x300) e as bibliotecas dos *reads* foram construídas pelo kit Nextera DNA Library Preparation e quantificadas pelo kit KAPA Library Quantification (MILANI et al. em preparação). Para este propósito, os *reads* obtidos do sequenciamento foram processados, filtrados e entrelaçados com as ferramentas disponíveis na plataforma Galaxy/RepeatExplorer (NOVÁK et al. 2013) para posterior montagem e caracterização de DNAs repetitivos pela clusterização baseada em gráficos. Posteriormente, as sequências similares ao AflaSAT-1 nos reads agrupados gerados pela clusterização foram procuradas manualmente pelo Geneious v.4.8.5 (DRUMMOND et al. 2009). Para a realização dessa procura foram considerados apenas os grupos (clusters) que apresentavam gráficos com alta densidade, típicos de DNAsat (NOVÁK et al. 2010). No grupo (cluster) encontrado que continha repetições do AflaSAT-1 foi também observado uma outra sequência associada a ele, o qual um par de primers foi desenhado a fim de recuperar essa sequência, F-5'GGGTCTCGCGAAATGAGAC e R-5'GCTTTCTAAACGGAATCGAG.

3.6. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e hibridização em membrana (Dot Blot)

Os produtos de PCR do DNAsat isolado da população de Rio Claro/SP foram utilizados como sondas em experimentos de FISH em cromossomos de indivíduos pertencentes as populações de Rio Claro/SP, Cabo/PE, Sta Bárbara do Pará/PA e Posadas/AR. Os fragmentos foram marcados com digoxigenin-11-dUTP por Nick Translation e detectados pelo anticorpo anti-digoxigenina rodamina (Roche, Mannheim, Germany) ou biotina-14-dUTP detectados com streptavidina Alexa Fluor-488 conjugado (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Os experimentos de FISH foram conduzidos seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1986), com pequenas adaptações de Cabral-de-Mello et al. (2010). Os experimentos de FISH em fibras de cromatina (fiber-FISH) foram conduzidos de acordo com Barros et al. (2011). As lâminas foram contra-coradas com DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole) e montadas com VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA). As imagens foram capturadas em escala de cinza utilizando uma câmera digital refrigerada DP70 acoplada a um microscópio Olympus BX51 equipado com uma lâmpada de fluorescência e filtros apropriados. As imagens foram pseudo-coloridas, mescladas e tratadas para brilho e contraste com Adobe Photoshop CS6.

Para checar se o AflaSAT-1 é compartilhado com outras espécies em nível de gênero, sub-família e família, foi realizado um experimento de Dot Blot utilizando como sonda a sequência obtida de indivíduos de Rio Claro/SP. A sonda foi testada contra os DNAs genômicos de *A. flavolineata* como controle positivo, a espécie congênica *A. dilecta* e

Vilerna rugulosa, uma espécie pertencente à mesma sub-família (Ommatolampidinae). Além disso, foram utilizadas outras espécies que pertencem à outras sub-famílias da família Acrididade, incluindo Melanoplinae (*Ronderosia bergi*), Cyrtacanthacridinae (*Schistocerca pallens*), Gomphocerinae (*Amblytropidea robusta*) e Leptysminae (*Eumastusia koebelei koebelei*). A presença do AflaSAT-1 foi também examinada por PCR em cada uma dessas espécies nas mesmas condições aplicadas para *A. flavolineata* descritas acima. Os resultados positivos foram todos checados por sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger (Macrogen Inc, Korea).

A sonda foi marcada por Nick Translation com biotina-14-dATP (Invitrogen). Aproximadamente 100 ng de DNA genômico de cada espécie foram transferidos à uma membrana de nylon Hybond N+ (GE Healthcare) utilizando o aparelho Bio-Dot Microfiltration (Bio-Rad Laboratories Inc.). O DNA genômico ligado à membrana foi desnaturado com NaOH 0.5 M por 2 minutos e a membrana foi posteriormente lavada em solução 5X SSC por 1 minuto. Após, a membrana foi secada por 90 minutos à 80°C.

A hibridização foi realizada durante 16 horas (overnight) à 37°C com 200 ng de sonda desnaturada diluída em solução tampão ECL gold hybridization (GE Healthcare), com a adição de albumina de soro (0.05% w/v) e NaCl (2.5 M). Após hibridação, as lavagens de membrana foram realizadas como se segue: 5X SSC por 5 minutos à 42°C; três vezes em tampão primário contendo uréia (6 M), 0.4% SDS (w/v) e 0.1X SSC por 10 minutos à 42°C cada; e 20X SSC por 5 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, o kit de detecção Biotin chromogenic (Thermo Scientific) foi utilizado de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.7. PCR em tempo real para número de cópias

Para verificar a variação no número de cópias do AflaSAT-1 entre distintas populações e em indivíduos machos abrigando um cromossomo B, foi realizada uma quantificação relativa pelo método de dosagem gênica ΔC_t (NGUYEN et al. 2013). Os ensaios de PCR quantitativa (qPCR) foram realizados utilizando o DNA genômico de exemplares machos de cada população em que foram obtidos resultados dos experimentos de FISH (Cabo/PE, Sta Bárbara do Pará/PA e Posadas/AR). Para a população de Rio Claro/SP, foi testado exemplares machos com e sem um cromossomo B e fêmeas sem cromossomo B. As taxas de dosagem gênica (GDR) foram obtidas seguindo os mesmos parâmetros de Valente et al. (2014) utilizando a proteína de choque térmico (Hsp70) como gene de referência (F-5'GGTGTGATGACCACTCTTATCAA e R-5'CACTTCAATTTGAGGCACACC). O gene

Hsp70 foi escolhido por não apresentar diferença nas taxas de amplificação entre os machos, fêmeas e indivíduos 0B e 1B, sugerindo que esse gene está localizado nos autossomos. O número de cópias relativo de AflaSAT-1 foi determinado comparando todos os dados com os dados obtidos dos indivíduos de Rio Claro/SP sem cromossomo B, já que não existe uma confirmação de que o gene Hsp70 é um gene de cópia única. A sequência alvo e o gene de referência foram analisados simultaneamente em duplicatas de quatro amostras independentes. As condições da qPCR foram: 95 °C por 10 min; 45 ciclos de 95 °C por 15s, e 60 °C por 1 min, realizada no equipamento StepOne Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Carlsbad, CA). A especificidade dos produtos de PCR foram confirmadas pela análise da curva de dissociação.

3.8. Extração de RNA e PCR de Transcriptase reversa

A fim de obter o DNA complementar da primeira cadeia (cDNA) e testar a possível atividade transcricional do AflaSAT-1 em distintos tecidos de machos e fêmeas e em diferentes estágios de desenvolvimento, os RNAs foram extraídos de tecidos de órgãos de machos e fêmeas adultos, incluindo a cabeça, patas saltatórias, testículos, ovariolos e cecos gástricos, além de embriões (com aproximadamente 20 dias de desenvolvimento) e ninfas de primeiro estágio (imediatamente após eclosão) da população de Rio Claro/SP. Exemplares machos com um cromossomo B foram também testados com todos os tecidos citados acima. Pelo menos três replicatas de amostras foram utilizadas para cada uma das situações. A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies) seguido por um tratamento com Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich) para evitar contaminantes de DNA. Finalmente, as amostras de cDNAs foram obtidas por reação de transcriptase reversa (RT-PCR) utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) com as seguintes condições: 25 °C por 10min; 37 °C por 120min, e 85 °C por 5min. Posteriormente, as amostras de cDNAs foram usadas como moldes para amplificação por PCR do AflaSAT-1.

Para validar os sinais de transcrição e para confirmar se as amostras não foram contaminadas com DNA genômico, as amostras de cDNAs foram usadas como molde para amplificação do gene Hsp70. A amplificação do gene Hsp70 em amostras de DNA e amostras de cDNA não contaminadas revelaram bandas com tamanhos diferentes, i.e. aproximadamente 300 pb e 200 pb, respectivamente. Esta diferença é resultado da presença de regiões intrônicas do DNA genômico, o qual não se apresenta após a transcrição e processamento do RNA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da presente dissertação estão apresentados no manuscrito a seguir a ser submetido a revista *Chromosome Research* (ISSN: 1573-6849).

4.1 Capítulo 1:

Uncovering the evolutionary history of a satellite DNA in the genome of the grasshopper *Abracris flavolineata*

Diogo Milani, Érica Ramos, Vilma Loreto, Dardo Andrea Martí, Aauto Cardoso, Cesar Martins, Karen C. Martinez de Moraes, Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Manuscrito a ser submetido à revista Chromosome Research

**Uncovering the evolutionary history of a satellite DNA in the genome of the grasshopper
*Abracris flavolineata***

Diogo Milani¹, Erica Ramos², Vilma Loreto³, Dardo Andrea Martí⁴, Adauto Cardoso², Karen
Cristiane Martinez de Moraes¹, Cesar Martins², Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello^{1,*}

1UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB, Departamento de Biologia,
Rio Claro, São Paulo, Brazil

2UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB, Departamento de Morfologia,
Botucatu, São Paulo, Brazil

3UFPE - Univ Federal de Pernambuco, Centro de Biociências/CB, Departamento de
Genética, Recife, Pernambuco, Brazil

*Short running title: AflaSAT-1 in the grasshopper *Abraris flavolineata**

**Corresponding author:* UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB,
Departamento de Biologia, CEP 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil Phone/Fax: 55 19
35264152. E-mail: mellodc@rc.unesp.br

Abstract

Satellite DNAs (satDNA) are sequences usually repeated hundred to thousand times tandemly arrayed, enriched in heterochromatin from specific region or chromosomes, including B chromosomes. Here, we isolated the first satDNA in the grasshopper *Abracris flavolineata*, named AflaSAT-1. The sequence was characterized by integration of cytogenetic, molecular and genomics approaches, aiming to understand the structural organization, evolution in A and B chromosomes and possible transcriptional activity. The AflaSAT-1 is shared with other grasshopper species, but it was evidently amplified in *A. flavolineata* forming detectable clustered arrays. AflaSAT-1 presented low variability at interpopulational level; but monomers from B chromosome observed in individuals from Rio Claro/SP were more variable presenting four exclusive mutations, reflecting the common higher mutational rate in this chromosome. Genomic structural analysis revealed distinct organization for the satDNA, with its alternative association with other satDNA, named AflaSAT-2. The chromosomal analysis showed that both satDNAs were also interglimed to each other, forming large blocks in centromeres of almost all chromosomes (except the smallest pair), but in the B chromosome only a small centromeric signal was noticed in individuals from Rio Claro/SP. Chromosomal distribution for AflaSAT-1 revealed variability, at populational level, with absence of marks, additional clusters and heteromorphism. This variation was coincidentally followed by variability in copy number, suggesting dynamic expansion or elimination of repeats. Finally, AflaSAT-1 was constitutively transcriptionally active in five tissues of adults, in distinct life cycle phases, and both in carrier and non-B chromosome carriers.

Key-words: B chromosome, repetitive DNA, genome organization, tandem repeat, transcription

Introduction

For more than half century researchers attempt to understand the complexity and evolution of repetitive DNA. This fraction of the genome was in time considered to not reveal any kind of functionality (Orgel and Crick 1980) as the traditional designation of junk DNA suggested, however, due to the technological advance allowing deeper analysis, nowadays the repetitive DNAs are known to be associated with several functions, like the heterochromatin formation, regulation, repair, gene expression regulation, replication process, among others (see for example Anleitner and Haymer 1992; Kraemer and Schmid 1993; Messier et al. 1996; Shapiro and Sternberg 2005; Ugarković 2005; Biémont and Veira 2006; Feschotte and Pritham 2007; Pezer et al. 2011; López-Flores and Garrido-Ramos 2012; Kuhn 2015).

Repetitive DNAs are classified depending on the rate of repetitiveness, and how they are arranged in the genome, including Transposable Elements (TEs), minisatellite, microsatellite and satellite DNA (satDNA) (Biémont and Vieira 2006; Plohl et al. 2012). The satDNAs comprise the highly repetitive genome fraction organized by repetitions directly contiguous to each other, i.e. in tandem, forming long arrays with hundreds of copies, generally composed by 100-1000 base pairs (Charlesworth et al. 1994). These in tandem arrays compose the major content of heterochromatin in eukaryotes, associated generally with the centromeres and telomeres (John and Miklos 1979; Charlesworth et al. 1994; Ugarković and Plohl 2002; Palomeque and Lorite 2008). These sequences evolve by the homogenization and fixation of distinct variants in a determined sexual population by a process named as concerted evolution (Dover 1986; Dover 2002). Molecular mechanisms of DNA turnover, such as unequal crossing over and gene conversion are the major responsible for this homogenization pattern, leading to quantitative changes between species and undergoing on specific variants generating specific satDNA subfamilies with differential arrangements and organization in a given genome (Pons et al. 2002; Plohl et al. 2008; Plohl et al. 2012).

A very characteristic genomic element that frequently accumulate satDNAs, are the B chromosomes (López-León et al. 1994; de Jesus et al. 2003; Camacho 2005; Houben et al. 2014; Klemme et al. 2013; Kumke et al. 2016). These chromosomes occur in about 15% of eukaryotes and are known to be dispensable for normal development, do not recombine with standard A genome and could present drive mechanism and accumulation (Camacho et al. 2000). Although frequently reported in some groups, the knowledge about satDNA populating the B chromosomes in insects is restrict to few species, as for example the grasshoppers *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al. 1994; 1995; Cabrero et al. 2003) and *Eumigus monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2016a), wasps (Nur et al. 1988; Eickbush et al. 1992), *Glossina* (Amos and Dover 1981) and *Drosophila* species (Gutknecht et al. 1994), all showing the directly association between the heterochromatic nature of B chromosomes and the accumulation of repetitive DNAs. In the organisms listed above, the isolated satDNA helped in the tracking of origin and evolution of the B chromosomes.

In the male grasshopper *Abracris flavolineata* ($2n=23,X0$) was detected one or two submetacentric B chromosomes in individuals from a population sampled in Rio Claro/SP-Brazil (Bueno et al. 2013). The origin and evolution of B chromosome were adressed using repetitive DNAs as markers (Bueno et al. 2013; Milani and Cabral-de-Mello 2014; Palacios-Gimenez et al. 2014). In this study we isolated through restriction enzymatic digestion the first satDNA (AflaSAT-1) in the species, named AflaSAT-1 aiming to a deeper knowledge concerning the satDNAs among grasshoppers and their contribution to B chromosome structure and evolution in *A. flavolineata*. AflaSAT-1 was studied by a combination of chromosomal and molecular analysis at population level uncovering its genome organization and evolution in A and B chromosomes.

Materials and Methods

Animal sampling

Male and female adults of *A. flavolineata* were collected at five distinct sites in Brazil (BR) and one in Argentine (AR), including Rio Claro/SP (São Paulo) 22°24'45"S; 47°31'28"W, Cabo/PE (Pernambuco) 8°17'15''S; 35°2'7''W, Sta. Bárbara do Pará/PA (Pará) 1°13'27''S; 48°17'38''W, Paranaíta/MT (Mato Grosso) 9°40'25''S; 56°28'36''W, Manaus/AM (Amazonas) 3°06'02''S; 59°58'31''W and in Posadas/Misiones/AR (Argentine) 27°24.991'S; 55°55.949'W. Testes were fixed in 3:1 absolute ethanol:acetic acid and stored at -20 °C. Entire animals were immersed in absolute Ethanol and stored at -20 °C for genomic DNA (gDNA) extraction. We obtained tissues for DNA extraction and to chromosome obtaining from Rio Claro/SP, Cabo/PE, Sta Bárbara do Pará/PA and Posadas/AR, while from Manaus/AM and Paranaíta/MT populations only tissues for DNA extraction was obtained.

Animals collected in Rio Claro/SP were deposited in breeding boxes until laying to embryo obtaining. Embryo mitotic cells were obtained from embryo dissection about 15 days after laying, following Webb et al. (1978) method.

Restriction enzymatic digestion, cloning and primer design

The genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method (Sambrook and Russel 2001) and stored in -20 °C until use. Genomic DNA of the specimens from Rio Claro/SP population was fragmented by restriction enzymatic digestion using *Hind*II, *Alu*I and *Sma*I enzymes. The digested products were fractionated by electrophoresis in 1% agarose and fragments with ladder pattern were purified using the kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Resarch Corp., The Epigenetics Company, USA) according to the manufacturer instructions.

The purified products were cloned using the pMOS*Blue* Blunt Ended Cloning Kit (GE Healthcare) with DH5α *Escherichia coli* as competent cells. Positive colonies were randomly

chosen and screened by Polymerase Chain Reaction (PCR) using M13 primers set (F-5'GTAAAACGACGGCCAG and R-5'CAGGAAACAGCTATGAC) and product were sent for DNA sequencing (Macrogen Inc. Company, Korea). The sequence quality and exclusion of the vector sequences was performed with Geneious software v.4.8.5 (Drummond et al. 2009). Specific primer set (F-5'GACAGTTTTTAAACACTTCCATTACAG and R-5'GACTGTGTTGATATCCAATAACA) was designated to amplify through PCR the satDNA sequence (AflaSAT-1).

AflaSAT-1 PCR amplification and sequence analysis

PCR amplification using specific designed primers for AflaSAT-1 was conducted using the genomic DNA of individuals belonging to the six distinct populations, besides from the B chromosome previously microdissected (μ B-DNA) from individuals from Rio Claro/SP (Menezes-de-Carvalho et al. 2015). PCR conditions were an initial denaturation at 94°C for 5 min and 30 cycles at 94°C (30s), 55°C (30s), and 72 °C (80 s), plus a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were visualized on a 1 % agarose gel, and the bands were isolated and purified using the Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA) according to producer's recommendations.

The purified PCR products it were cloned using pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) with DH5 α *Escherichia coli* as competent cells. Positive clones were screened using the M13 primer set and sequenced by Macrogen Inc. (Korea) Company.

The monomer sequences were analyzed using Geneious v.4.8.5 (Drummond et al. 2009) and then, to check the DNA polymorphism and haplotype recognition it was used DnaSP v.5.10.01 tool (Librado and Rozas 2009). For more accurate analysis, singleton sequences were discarded. A graphical haplotype network was constructed employing the Network 4.6.1.2 software (<http://www.fluxus-engineering.com>) and a neighbor joining tree by

p-distance model was generated using the MEGA6 software (<http://www.megasoftware.net>). The correspondent haplotype sequences will be deposited in NCBI database under accession numbers.

We searched the AflaSAT-1 repeats in the sequenced genome of *A. flavolineata* from an individual harboring one B chromosome. This genome was sequenced using Illumina Miseq paired-end (2x300), the libraries was constructed using Nextera DNA Library Preparation Kit and quantified by KAPA Library Quantification Kit (Milani et al. in preparation). For this proposes we applied the graph-based clustering and assembly using RepeatExplorer (Novák et al. 2013) and searched manually sequences similar to AflaSAT-1 in the assembled contigs using Geneious v4.8.5 (Drummond et al. 2009). For this search we considered only clusters showing high graph density that is typical for satDNA (Novák et al. 2010). In the cluster containing the AflaSAT-1 we also observed another associated sequence and a primer set to recover this sequence was designed, F-5'GGGTCTCGCGAAATGAGAC and R-5'GCTTTCTAAACGGAATCGAG.

Chromosome obtaining and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

Meiotic cells were obtained from testis, while mitotic ones from embryos. The slides were obtained by tissue maceration and then stained with Giemsa 5% for conventional analyzes to check the general chromosomal structure of animals from distinct populations.

The PCR products from satDNAs from Rio Claro/SP individuals were used as probes for FISH assays using chromosomes of individuals belonging to the populations of Rio Claro/SP, Cabo/PE, Sta Bárbara do Pará/PA and Posadas/AR. Fragments were labeled by nick translation using digoxigenin-11-dUTP and detected by anti-digoxigenin rhodamine (Roche, Mannheim, Germany) or biotin-14-dUTP detected with streptavidin Alexa Fluor-488 conjugated (Invitrogen, San Diego, CA, USA). FISH experiments were conducted following

Pinkel et al. (1986), with adaptations by Cabral-de-Mello et al. (2010). Fiber-FISH was conducted according to Barros et al. (2011). Slides were counterstained with DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole) and mounted with VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA). Pictures were captured using a DP70 cooled digital camera in grayscale coupled with an Olympus microscope BX51 equipped with a fluorescence lamp and appropriate filters. The images were pseudo-colored, merged and treated for brightness and contrast using Adobe Photoshop CS6.

Dot Blot hybridization

To check if the AflaSAT-1 is shared with other species at genus, sub-family and family level we run a Dot Blot experiment followed the descriptions of Anjos et al. (2016), using as probe the sequence amplified from individuals from Rio Claro/SP in other six species. The probe was tested against the genomic DNA of *A. flavolineata* as positive control and the congeneric species *A. dilecta* and *Vilerna rugulosa*, a species belonging to the same subfamily (Ommatolampidinae). Moreover we used species belonging to other Acrididae subfamilies, including Melanoplinae (*Ronderosia bergi*), Cyrtacanthacridinae (*Schistocerca pallens*), Gomphocerinae (*Amblytropidia robusta*) and Leptysminae (*Eumastusia koebelei koebelei*). The presence of AflaSAT-1 was also tested through PCR in each species following the same conditions applied for *A. flavolineata* described above and the results checked by nucleotide sequencing.

Copy number detection by qPCR

To verify the copy number of AflaSAT-1 between distinct populations and in individuals harboring one B chromosome we performed a relative quantification employing the gene dose ΔCt method (Nguyen et al. 2013). qPCR assays were done using the gDNA

from male samples of each population in which we obtained FISH results, i.e. Cabo/PE, Sta Bárbara do Pará/PA and Posadas/AR. For the Rio Claro/SP population we tested males with and without one B chromosome and females without B chromosome. The gene dosage ratios (GDR) were obtained following the same parameter of Valente et al. (2014) using the Heat Shock Protein (Hsp70) as reference gene (F-5'GGTGTGATGACCACTCTTATCAA and R-5'CACTTCAATTTGAGGCACACC) since there was no difference in amplification ratio between males, females and 0B and 1B individuals. Our results support that the Hsp70 gene is placed in autosomes, considering no difference between males and females. The target and reference gene were analyzed simultaneously in duplicates of four independent samples. The qPCR conditions were 95 °C for 10min; followed by 45 cycles of 95 °C for 15s, and 60 °C for 1min, performed in the StepOne Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Carlsbad, CA). Specificity of the PCR products was confirmed by analysis of the dissociation curve.

RNA extraction and transcriptional analyses

The RNA was extracted from organs tissues of male and female adults, including head, saltatory legs, testis, ovariole and gastric caecum and in both embryos (with 20 days of development) and nymphs in first stage (immediately after hatch) from Rio Claro/SP population. We also tested the distinct above cited tissues from adult males with 1B. RNA extraction was assign using TRIzol® Reagent (Life Technologies) and then treated with Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich) to avoid DNA contaminants. Finally, the cDNAs samples were obtained by reverse transcription (RT-PCR) using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) where the reaction conditions were 25 °C for 10min; 37 °C for 120min, and 85 °C for 5min. Posteriorly, the cDNAs samples were used as template for conventional PCR amplification of AflaSAT-1. At least three biological replicates for each situation were run.

To validate the signals of transcription and to be sure that the samples are not contaminated with genomic DNA, the cDNAs samples were used as source for amplification of Hsp70 as a control. The amplification of Hsp70 gene in genomic DNA samples and uncontaminated cDNA samples reveal band with distinct sizes, i.e. approximately 300 bp and 200 bp, respectively. This difference is caused by the presence of an intron in genomic DNA that is not present after RNA transcription and processing. Some PCR products were sequenced to confirm the HSP70 sequence.

Results

Isolation and characterization of satDNA sequences

The gDNA digestion using three distinct restriction endonucleases (RE), *HindII*, *AluI* and *SmaI*, revealed a ladder pattern for *HindII* and *SmaI* enzymes with bands of about 150 bp, 300 bp, 450 bp, corresponding to monomer and multimers of a putative tandem sequence. The monomer generated by *HindII* was selected for further analysis (Figure 1a). The sequence was 173 bp long and the convergent internal primer designed recovered a fragment containing 137 bp, which formed a ladder pattern, typical for satDNAs (Figure 1b,c). This sequence was named AflaSAT-1. Internal restriction sites for other enzymes were also recognized in AflaSAT-1 (Figure 1c).

AflaSAT-1 was detected through PCR in individuals sampled in the six populations, besides in the μ B-DNA from Rio Claro/SP. A total of seventy-nine AflaSAT-1 sequences were recovered after cloning the product from individuals from Rio Claro/SP (15 clones), μ B-DNA from Rio Claro/SP (10 clones), Cabo/PE (11 clones), Santa Bárbara do Pará/PA (10 clones), Paranaíta/MT (11 clones), Manaus/AM (12 clones), and Posadas/AR (10 clones). The AflaSAT-1 was similar in composition in all populations, presenting about 44.0% of G+C base pairs. Distinct number of haplotypes was recognized depending of the population and

considering the all sequences, 11 haplotypes were recognized. The number of mutation and variable sites was slightly higher in the sequences recovered from μ B-DNA. Nucleotide and haplotype diversity was also slightly variable, reaching the highest value in Cabo/PE (Table 1).

A minimum spanning tree revealed the relationship between the 11 haplotypes from all populations (Figure 2). Tree of the eleven haplotypes were shared among at least five populations (Hap1, Hap3 and Hap5). The difference between the haplotypes was only one mutation (substitution), except for the haplotypes from exclusive μ B-DNA that were differentiated between three or four mutations, i.e. Hap4 and Hap11. Finally, the μ B-DNA presented a sequence grouped to Hap2, which occurs in Cabo/PE and Manaus/AM populations (Figure 2).

We identified one cluster presenting similarity with AflaSAT-1 in the assembly of NGS dataset analysed under RepeatExplorer. This cluster represented 1.04% of the genome, corresponding to the fourth most representative sequence in the genome of *A. flavolineata*. The cluster retrieved a total of 32 contigs and it was possible to recover only 19 entire sequences of AflaSAT-1 besides truncated sequences, and, as we do not know if these sequences is from A or B chromosomes we did not included the sequences in our analysis. Unexpectedly, in a few contigs were found a distinct sequence containing 242 bp long besides the presence of AflaSAT-1. Such sequence was named AflaSAT-2. For this repeat we recovered ten entire sequences, and some truncated repeats. In the recovered contigs two arrangements were noticed, only the AflaSAT-1 and AflaSAT-1 plus AflaSAT-2, but never the AflaSAT-2 alone.

Chromosome distribution and copy number variation of AflaSAT-1 in populations of *A. flavolineata*

The FISH using AflaSAT-1 and AflaSAT-2 probes in individuals from Rio Claro/SP revealed large pericentromeric blocks in all chromosomes with blocks varying in size, but just pair 11 that did not presented signals (Figure 3a-d). The B chromosome showed a small signal in the centromeric region (Figure 3e,f). These two sequences were interglimed each other, as observed in experiments of fiber-FISH (Figure 3g). The association of AflaSAT-1 and AflaSAT-2 was also observed in the sequences retrieved from sequenced genome forming a composed unit.

At populational point of view the chromosomal distribution for AflaSAT-1 was identical in individuals from Rio Claro/SP and in individuals from Sta. Bárbara do Pará/PA (Figure 4a). In the other populations slightly variation was noticed, i.e. in Cabo/PE the pair 1 did not presented signal and the pair 11 presented small positive signal (Figure 4b), while individuals from Posadas/AR presented signals in all chromosomes (Figure 4c).

Copy number variation of AflaSAT-1, through qPCR, was observed. Males without and with one B chromosome from Rio Claro/SP showed differences, with the individuals harboring B chromosome presenting higher copy number, as expected. Females from Rio Claro/SP also presented higher copy number, which is attributed to the presence of two copies of X chromosome. Individuals from Cabo/PE presented lower number of copies, while individuals from Santa Bárbara do Pará/PA presented similar number of copies in comparison to Rio Claro/SP. Finally individuals from Posadas/ AR presented higher number of copies (Figure 5). The high standard deviations, considering the absolute copy number quantification indicate that the copy number of AflaSAT-1 is very unstable and variable individually (Supplementary material 2).

Occurrence of AflaSat-1 in other grasshopper species

Among the six species in which the presence of AflaSAT-1 was tested through dot blot none revealed positive signals. Positive hybridization was restricting to genomic DNA from *A. flavolineata*. However, through PCR amplification the AflaSAT-1 monomer was noticed for *A. dilecta*, *V. rugulosa* and *R. bergi*, confirmed through sequencing of PCR products for each species (Supplementary material 3).

Transcriptional activity of AflaSAT-1

RT-PCR analysis revealed that AflaSAT-1 is transcriptionally active in all tested distinct organs tissues of male and female adults, like in both embryos and nymphs. The 1B male individuals also presented transcriptional activity for AflaSat-1. In all cases it was evidenced by bands corresponding to monomers and tetramers of AflaSAT-1 DNA (Figure 6). The sequencing of monomer from randomly selected samples confirmed the specific transcriptional activity of AflaSAT-1.

Discussion

AflaSAT-1 organization and evolution in A chromosomes of *Abracris flavolineata*

The description of satDNA families has been restricted to 12 grasshopper species, most of them Acrididae members. The representativeness of AflaSAT-1 in *A. flavolineata* genome is low, i.e. 1.04%, being the fourth most abundant repetitive DNA, according to the RepeatExplorer analysis. In other grasshopper species the abundance of distinct satDNA families is variable, like in *Schistocerca gregaria* with distinct satDNA families representing, for example, about 18% (SG1), 12% (SG2-alfa) and 0.22% (SG3) (Camacho et al. 2015); and in *Locusta migratoria* that presents variation in quantity for satDNA families from 0.98% to 0.00002% in genome of Southern individuals (Ruiz-Ruano et al. 2016b). But it is common

that the distinct satDNA repeats represent less than 1% for grasshopper genomes, like in *L. migratoria* and *E. monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2016a,b).

As expected, the general chromosomal distribution of AflaSAT-1 is coincident with pericentromeric heterochromatin a common pattern among eukaryotes and extensively noticed in grasshoppers, like in *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al. 1995), *Dociostaurus genei* (Rodríguez et al. 1996), *Schistocerca gregaria* (Camacho et al. 2015), *L. migratoria* (Ruiz-Ruano et al. 2016b) and *E. monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2016a).

The occurrence of another satDNA, i.e. AflaSAT-2, with the same distribution of AflaSAT-1 indicate a more complex structure. This complex structure is corroborated by the occurrence of two types of arrangements in *A. flavolineata* genome, similar to described in *Drosophila buzzatii* for pBuM-1 and pBuM-2 satDNA subfamilies (Kuhn et al. 2008). Other studies describe the same pattern for satDNA subfamilies with high homology in different species, like *Tribolium madens* (Žinić et al. 2000), *Nasonia vitripennis* (Reed et al. 1994) and also for non-homologous satDNAs subfamilies as noticed here, like in some *Drosophila species* (Kuhn et al. 2009), rye (Alkhimova et al. 2004) and rodent species (Paço et al. 2015).

Our interspecies analysis, using a combination of dotblot and PCR, revealed that AflaSAT-1 is not specific from *A. flavolineata*, because it was recovered from the genomes of other three species through PCR, although the dotblot did not revealed positive hybridization. It indicates that although it is not species-specific, AflaSAT-1 is in low copy number in the genomes *A. dilecta*, *V. rugulosa* and *R. bergi*, and it was highly amplified in the genome of *A. flavolineata*, generating the clustered organization. The possibility of no positive dotblot signals due to divergence between sequences among the distinct species is discarded because the sequencing of PCR products revealed almost no mutations between them. The sharing of AflaSAT-1 and its location on chromosomes with distinct species is according to the “library hypothesis” in which phylogenetically related species share satDNAs families, that could be

stochastically amplified or not in the diverging lineages (Fry and Salser 1977). Considering that *R. bergi* belongs to the subfamily Melanoplinae and *A. flavolineata*, *A. dilecta* and *V. rugulosa* belong to Ommatolampidinae and all share the AflaSAT-1 the origin of this satDNA occurred in a common ancestor before the divergence of the two subfamilies, that remits about less than 73 mya, that correspond to the time of origin of Acrididae (Song et al. 2015). Recently the most comprehensive comparison between the satellitome of two other grasshopper species, i.e. *L. migratoria* (Acrididae) and *E. monticola* (Pamphagidae), revealed that the lifespan of satDNA library is shorter than about 100 mya, that correspond to the most recent common ancestor between Acrididae and Pamphagidae (Ruiz-Ruano et al. 2016a). Our result is according with this lifespan, and that the divergence between satDNAs libraries is variable in Acridade, considering that the AflaSAT-1 was found in some species, depending from the subfamily, but not in other ones. The specific lifespan could be tested only when the diverging time between Acrididae subfamilies are available.

Molecular analysis of AflaSAT-1 showed a relative low variability for the sequences and between populations almost no distinction was noticed, similar to documented in other species, that not present any populational specific profile (Bachmann et al. 1994; Lorite et al. 2002; Kuhn and Sene 2004; Feliciello et al. 2011; Vieira et al. 2014). It is in accordance with concerted evolution model for homogenization repeats at intragenomic level. On the other hand, chromosomal variability was noticed for cluster number, size, distribution and abundance of repeats, depending of the population. The variation of hybridization signals of AflaSAT-1 between populations indicates that a random expansion (or contraction) of the satDNA may be occurring, generating different patterns in distinct population independently of geographic location. Variation related to the satDNA mapping also showed differences among populations of the frog *Physalaemus cuvieri* suggesting a high rate of amplification or deletion mutational events (Vittorazzi et al. 2014), as in the grasshopper *Eyprepocnemis*

plorans (Cabrero et al. 2013). As expected, the higher or lower number of chromosomal clusters for AflaSAT-1 in the different populations were also followed by the increase or decrease of AflaSAT-1 copy number, corroborating the dynamic of amplification and deletion of repeats. This copy number change could be induced by several events, like unequal crossing-over, slippage replication, extrachromosomal circular DNA and rolling-circle, which are common for repetitive DNAs (Charlesworth et al. 1994; Ma and Jackson 2006; Navrátilová et al. 2008).

AflaSAT-1 and its relationship with the B chromosome

Among grasshoppers the characterization of satDNA in B chromosomes was reported in a few species as *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al. 1994) and *Eumigus monticola* (Ruiz-Ruano et al. 2016a). In *A. flavolineata*, the DNAsat AflaSAT-1 did not revealed clues concerning the origin of the B chromosome, due to its occurrence in almost all centromeres of A complement. However, this satDNA helped to understand the composition and evolution of the B chromosome. Distinct studies revealed the absence of C-positive blocks (Bueno et al. 2013; Milani and Cabral-de-Mello 2014) and the occurrence of distinct sequences shared with the euchromatic regions of A complement, remarkably mobile elements and the anonymous sequences obtained from microdissected B chromosome (Palacios-Gimenez et al. 2014; Menezes-de-Carvalho et al. 2015). The sequences enriched in heterochromatin of A complement that occurs in the B chromosome are restrict to small signal in centromeric region, as described here for AflaSAT-1 and the C₀t-1 DNA (Bueno et al. 2014). These data together suggests that in the B chromosome of *A. flavolineata* the sequences with heterochromatic nature were not amplified, as it is frequently observed in other species (Houben et al. 2014) and in this chromosome probably remains some unknown euchromatic

sequences. The investigation of genes and other satDNAs should be conducted to have a more precise picture about this scenario.

Despite the low variability between the populations, molecular analysis of AflaSAT-1 from the microdissected B chromosome revealed exclusive mutations, higher number of variable sites and number of mutations in this chromosome. The higher sequence variability in B chromosomes in comparison to A complement is commonly reported and it is attributed to the higher tolerance of mutations due to its dispensable nature (Camacho 2005). Similar data was also observed for other types of repetitive DNAs, like histone genes and 18S rRNA gene in the grasshopper *L. migratoria* (Teruel et al. 2010) and in the fish *Astyanax paranae* (Silva et al. 2014). However, in *E. plorans* two distinct sequences (satDNA and 45S rDNA) and in *A. flavolineata* the U2 snDNA, revealed different homogenization patterns with high similarity between A and B chromosomes (Teruel et al. 2014; Menezes-de-Carvalho et al. 2015). The higher sequence variability in B chromosomes would mean the presence of mechanisms that stimulate new satDNA sequences to the B chromosome of *A. flavolineata*. The sequence variability discrepancy observed for the two repetitive DNAs present in the B chromosome of *A. flavolineata* suggests that the B chromosome does not govern alone the evolutionary fate for the sequences that are on it, leading to accumulation or not of mutations, but it will depend also for the possible role of the sequence in the genome.

AflaSAT-1 is transcriptionally active satellite sequence

Despite transcriptional activity of satDNAs was not expected for long a while, satDNA transcripts were reported in distinct eukaryotes, suggesting that satellite transcription might be a common placement (Plohl et al. 2008). These repetitive sequences have several roles related to the regulation of heterochromatin acting by several processes, as for an example, as precursors of small interfering RNAs (Ugarković 2005). Among insects, satDNA

transcription has been described generally in species from Hymenoptera, Orthoptera, Diptera and Coleoptera (reviewed by Pezer et al. 2011), besides in the Lepidoptera *Cydia pomonella* (Věchtová et al. 2016).

AflaSAT-1 has constitutional transcriptional activity, suggesting an unknown biological role. Regulatory roles for satDNAs was suggested in some insects, with differential transcription occurring related to different developmental-stages, tissue-specific and also in different sexes (Lorite et al. 2002; Rouleux-Bonnin et al. 2004; Ugarković 2005). In *Drosophila*, it was reported that satDNA might be involved in centromere function, chromatin silencing and modulation, heterochromatin formation and regulation of genes linked to sex chromosomes (Kuhn 2015). In *A. flavolineata* the possible differential transcription rate should be checked for distinct tissues, besides in the presence of the B chromosome that do not inhibits, at least entirely, the AflaSAT-1 transcription.

Acknowledgements

This study was partially supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (process number 2011/19481-3) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES. DM is supported by FAPESP (process number 2015/05246-3). The authors are grateful to Dr. Thiago Gazoni for sampling in Manaus/AM, Paranaíta/MT and to administration of Parque Estadual Edmundo Navarro de Andrade for collecting authorization. DCCM was the recipient of a research productivity fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (process number 304758/2014-0).

References

- Alkhimova OG, Mazurok NA, Potapova TA et al (2004) Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes. *Chromosoma* 113(1) 42-52.
- Amos A, Dover G (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81(5) 673:690.
- Anjos A, Loreto V, Cabral-de-Mello DC (2016) Organization of some repetitive DNAs and B chromosomes in the grasshopper *Eumastusia koebelei koebelei* (Rehn, 1909) (Orthoptera, Acrididae, Leptysminae). *Comparative Cytogenetics* 10(2): 219-228.
- Anleitner J, Haymer D (1992) Y enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Chromosoma*, 101: 271-278.
- Bachmann L, Venanzetti F, Sbordoni V (1994) Characterization of a species-specific satellite DNA of *Dolichopoda schiavazzi* (Orthoptera, Rhaphidophoridae) cave crickets. *J Mol Evol* 39:274–281.
- Barros AV, Sczepanski TS, Cabrero J et al (2011) Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture* 322-323:47-50.
- Biémont C, Vieira C (2006) Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521-524.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. *PLoS ONE* 8:e66532.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an

association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 104: 393-400.

Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A et al (2003) Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112:207–211.

Cabrero J, López-León MD, Ruíz-Estévez M et al (2013) B1 was the ancestor B chromosome variant in the western Mediterranean area in the grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. *Cytogenetic and genome research* 142(1) 54-58.

Camacho JM, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R et al (2015) A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. *Chromosoma* 124(2) 263-275.

Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: Gregory TR, ed. *The Evolution of the Genome*. Amsterdam: Elsevier, pp. 223–286.

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000). B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 163-178.

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

de Jesus MC, Galetti PM, Valentini SR, Moreira-Filho O (2003) Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25–32.

Dover GA (1986) Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 2: 159–165.

Dover GA (2002) Molecular drive. *Trends Genet* 18: 587–589.

Drummond AJ, Ashton B, Cheung M et al (2009) Geneious v4.8.5, Available from. <http://www.geneious.com>.

- Eickbush DG, Eickbush TH, Werren JH (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma* 101:575- 583.
- Feliciello I, Chinali G, Ugarković D (2011) Structure and evolutionary dynamics of the major satellite in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genetica* 139:999–1008.
- Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Ann Rev Genet* 41:331-368.
- Fry K, Salser W (1977) Nucleotide sequences of HS-alfa satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterisation of similar sequences in other rodents. *Cell* 12: 1069-1084.
- Gutknecht J, Sperlich D, Bachmann L (1994) A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma* 103: 539-544.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(3) 467-478.
- John B, Miklos GL (1979) Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. In: Bourne GH, Danielli JF (Eds.). *International Review of Cytology*, New York: Academic Press, v. 58, pp. 1- 114.
- Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A (2013) High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytol* 199(2):550-8.
- Kraemer C, Schmidt ER (1993) The sex determination region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma* 102: 553-562.

- Kuhn GC (2015) Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. *Heredity* (Edinb) 115(1):1-2.
- Kuhn GC, Sene FM, Moreira-Filho O, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2008) Sequence analysis, chromosomal distribution and long-range organization show that rapid turnover of new and old pBuM satellite DNA repeats leads to different patterns of variation in seven species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *Chromosome Research* 16(2) 307-324.
- Kuhn GCS, Sene FM (2004) Characterization and interpopulation variability of a complex HpaI satellite DNA of *Drosophila seriema* (repleta group). *Genetica* 121, 241– 249.
- Kuhn GCS, Teo CH, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2009) Evolutionary dynamics and sites of illegitimate recombination revealed in the interspersion and sequence junctions of two nonhomologous satellite DNAs in cactophilic *Drosophila* species. *Heredity* 102(5) 453-464.
- Kumke K, Macas J, Fuchs J, Altschmied L, Kour J, Dhar MK, Houben A (2016) *Plantago lagopus* B Chromosome Is Enriched in 5S rDNA-Derived Satellite DNA. *Cytogenetic and genome research* 148(1), 68-73.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn.* 7:1-28.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2: 87–92.

- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM, Camacho JPM (1995) Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75, 370–375.
- Lorite P, Carrillo JA, Tinaut A, Palomeque T (2002) Comparative study of satellite DNA in ants of the *Messor* genus (Hymenoptera, Formicidae). *Gene* 297: 113–122.
- Ma J, Jackson SA (2006) Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome research* 16(2) 251-259.
- Menezes-de-Carvalho NZ, Palacios-Gimenez OM, Milani D, Cabral-de-Mello DC (2015) High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. *Mol Genet Genomics* 290(5):1787-92.
- Messier W, Li S-H, Stewart C-B (1996) The birth of microsatellites. *Nature* 381:483.
- Milani D, Cabral-de-Mello DC (2014) Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS ONE* 9:e97956.
- Navrátilová A, Koblížková A, Macas J (2008) Survey of extrachromosomal circular DNA derived from plant satellite repeats. *BMC plant biology* 8(1), 90.
- Nguyen P, Sykorova M, Sichova J et al (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:6931–6936.
- Novák P, Neumann P, Macas J (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 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 (6): 792-793.

- Nur U, Werren JH, Eickbush DG, Burke WD, Eickbush TH (1988) A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 240: 512-514.
- Orgel LE, Crick FHC (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*. 284, 604-607.
- Paço A, Adegá F, Meštrović N, Plohl M, Chaves R (2015) The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). *Chromosome Research* 23(3) 427-440.
- Palacios-Gimenez OM, Bueno D, Cabral-de-Mello DC (2014) Chromosomal mapping of two *Mariner*-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) reveals enrichment in euchromatin. *Eur. J. Entomol.* 111(3): 000–000.
- Palomeque T, Lorite P (2008) Satellite DNA in insects: a review. *Heredity*, v.100 p.564–573.
- Pezer ZI, Brajković J, Feliciello I, Ugarković D (2011) Transcription of Satellite DNAs in Insects. *Prog Mol Subcell Biol.* 51:161-78.
- Pinkel D, Lanlegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9138-42.
- Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72–82.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2012) Satellite DNA evolution. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Repetitive DNA. Genome dynamics*, 7th edn. Karger, Basel, pp 126–152.

- Pons J, Petitpierre E, Juan C (2002) Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Mol Biol Evol* 19(8):1329-40.
- Reed KM, Beukeboom LW, Eickbush DG, Werren JH (1994) Junctions between repetitive DNAs on the PSR chromosome of *Nasonia vitripennis*: association of palindromes with recombination. *Journal of molecular evolution* 38(4) 352-362.
- Rodríguez IE, Fernández-Calvín B, Capel J, La Vega D, García C (1996) Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: in situ localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). *Heredity* 76(1).
- Rouleux-Bonnin F, Bigot S, Bigot Y (2004) Structural and transcriptional features of *Bombus terrestris* satellite DNA and their potential involvement in the differentiation process. *Genome* 47: 877–888.
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (2016a) Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma* 1-14.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2016b) High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports* 6.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. US. v1.
- Shapiro JA, Sternberg R (2005) Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev* 80:1-24.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R et al (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS ONE* 9(4): e94896.

- Song H, Amédégno C, Cigliano MM et al (2015) 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics* 31(6) 621-651.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217–225.
- Teruel M, Ruíz-Ruano FJ, Marchal JA, Sánchez A, Cabrero J, Camacho JPM, Perfectti F (2014) Disparate molecular evolution of two types of repetitive DNAs in the genome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 112, 531–542.
- Ugarković D (2005) Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* 6:1035– 1039.
- Ugarković D, Plohl M (2002) Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO J* 21:5955-5959.
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BE et al (2014) Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses. *Mol Biol Evol* 1-12.
- Věchtová P, Dalíková M, Sýkorová M et al (2016) CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. *Genetica* 144: 385.
- Vieira P, et al (2014) Sequence variability of the MspI satellite DNA family of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* at different geographic scales. *Mol Phylogenet Evol* 70:120–129.
- Vittorazzi SE, Lourenço LB, Recco-Pimentel SM (2014) Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. *BMC Genet* 15(111): 1–11.

Webb GC, White MJD, Contreras N, Cheney J (1978) Cytogenetics of the parthogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. *Chromosoma* 67(4), 309-339.

Žinić SD, Ugarković D, Cornudella L, Plohl M (2000) A novel interspersed type of organization of satellite DNAs in *Tribolium madens* heterochromatin. *Chromosome Research* 8(3) 201-212.

Tables

Table 1. Polymorphisms of AflaSAT-1 in distinct populations of *A. flavolineata* and from μ B-DNA.

Figure captions

Figure 1. Agarose gel electrophoresis (a) genomic DNA (gDNA) (1) and the same gDNA digested with *Hind*II (2); (b) result of amplification of AflaSAT-1; (c) sequence of the monomeric unit of AflaSAT-1. In (a,b) L corresponds to 1Kb plus marker and asterisk indicate the monomere, dimere and trimer. The arrows in (c) show the internal primers.

Figure 2. Haplotype network for the eleven haplotypes and their relationship from sequences of AflaSAT-1 obtained from distinct populations. Black dots correspond to substitutions and the haplotype circle diameter corresponds to abundance. The distinct populations are represented in distinct colors.

Figure 3. FISH in mitotic embryo chromosomes (a-f) and in distended chromatin fiber (g) of AflaSAT-1 and AflaSAT-2 satDNAs in individuals without (a-d,g) and with one B chromosome (e,f). Arrows in (c,e,f) show the pair 11 and arrowhead in (e,f) the B chromosome. In (e,f) the B chromosome is highlighted in a inset. Each probe is indicated directly in the panel. Bar = 5 μ m.

Figure 4. Chromosomal location of AflaSAT-1 in three distinct populations of *A. flavolineata*. (a) Sta Bárbara do Pará/PA, (b) Cabo/PE and (c) Posadas/AR. The X chromosome is indicated and the arrows point the pair 11. In (b) the largest chromosome, chromosome 1, is also indicated.

Figure 5. Relative quantification of AflaSAT-1 from distinct populations of *A. flavolineata* in comparison to Rio Claro/SP 0B male individuals. (1) Rio Claro/SP male 0B, (2) Rio Claro/SP male 1B, (3) Rio Claro/SP female 0B, (4) Cabo/PE male 0B, (5) Sta Bárbara do Pará/PA male 0B, (6) Posadas/AR male 0B.

Figure 6. RT-PCR electrophoresis of AflaSAT-1 using as template cDNA obtained from distinct tissues, nymph and embryo. he = head, gc = gastric caecum, tes = testis, leg = saltatory leg, nym = nymph, emb = embryo, C- = negative control.

Supplementary files

Supplementary file 1. Neighbor joining tree analysis for AflaSAT-1 obtained from distinct populations and from μ B-DNA. The sequence database is the same used to obtain the data presented in figure 2. The color key for distinct populations is the same used in figure 2, green = Rio Claro/SP 0B, red = μ B-DNA, blue = Manaus/AM, yellow = Paranaíta/MT, purple = Cabo/PE, orange = Sta Bárbara do Pará/PA, brown = Posadas/AR. Note the occurrence of a separate clade containing the sequences recovered from μ B-DNA.

Supplementary file 2. qPCR data of gDNA used to calculate the sequence dose by Ct method of relative quantification (Nguyen et al. 2013). Gene dosage ratios (GDR) of the target genes were compared with autosomal gene Hsp70.

Supplementary file 3. (a) Dot blot analysis, (b) PCR electrophoresis of AflaSAT-1 and (c) Nucleotide alignment of positively amplified AflaSAT-1 fragments. Af = *Abracris*

flavolineata, 1 = *A. dilecta*, 2 = *Vilerna rugulosa*, 3 = *Ronderosia bergi*, 4 = *Schistocerca pallens*, 5 = *Amblytropidia robusta*, 6 = *Eumastusia koebelei koebelei*.

Table 1. Polymorphisms of AflaSAT-1 in distinct populations of *A. flavolineata* and from μ B-DNA.

	Rio Claro/SP 0B gDNA	Rio Claro/SP μ B-DNA	Manaus/AM	Paranaíta/M T	Cabo/PE	Sta Bárbara do Pará/PA	Posadas/AR	All
Number of sequences	15	10	12	11	11	10	10	79
Number of haplotypes	4	3	5	3	5	3	4	11
Number of sites	137	137	137	137	137	137	137	137
Number of variable sites	4	7	5	3	5	3	4	10
Number of mutations	4	6	5	3	5	3	4	10
G+C proportion	44,5%	44,6%	44,3%	44,3%	45,0%	44,5%	44,5%	44,5%
Nucleotide diversity (π)	0,00876	0,01217	0,01615	0,01035	0,01859	0,01071	0,01184	0,01951
Standard deviation (π)	0,00204	0,00725	0,00211	0,00172	0,00187	0,00165	0,00255	0,00141
Haplotype diversity (Hd)	0,600	0,511	0,833	0,655	0,855	0,689	0,644	0,845

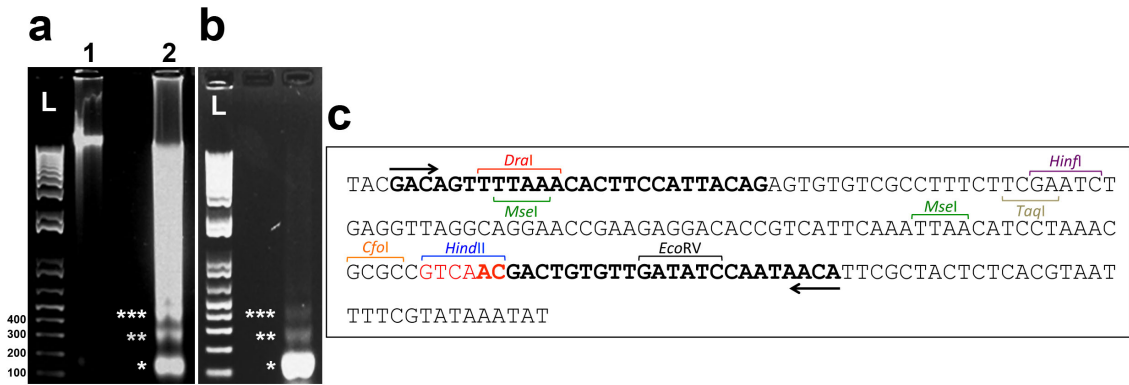


Figure 1

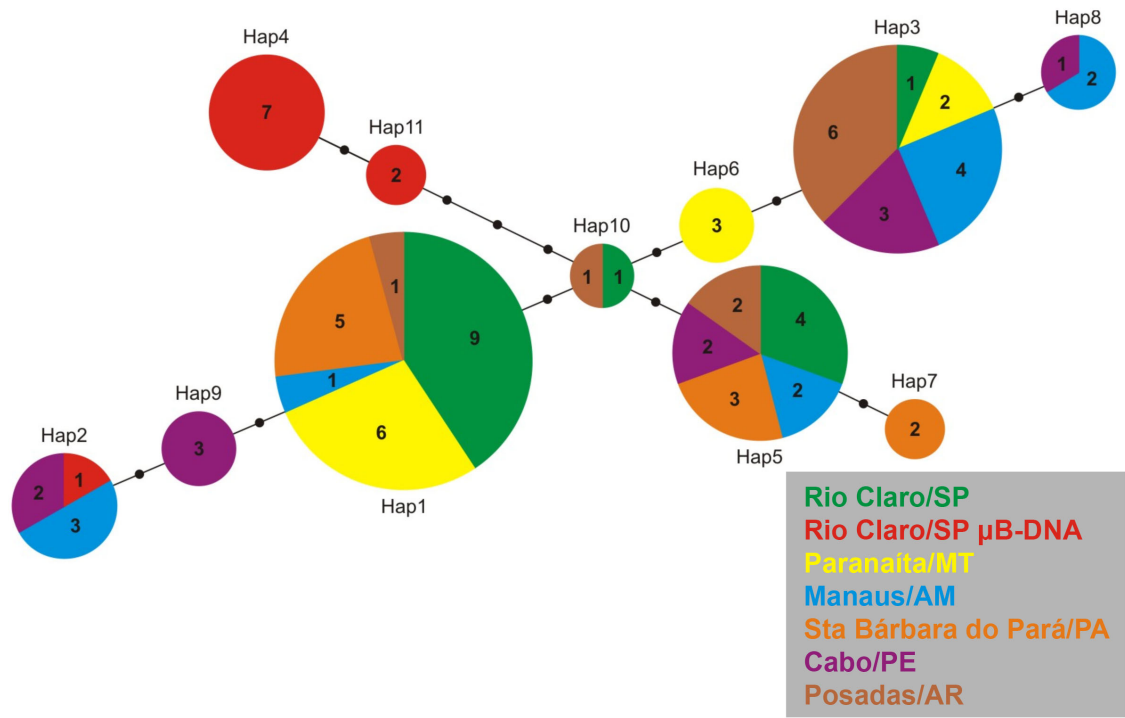


Figure 2

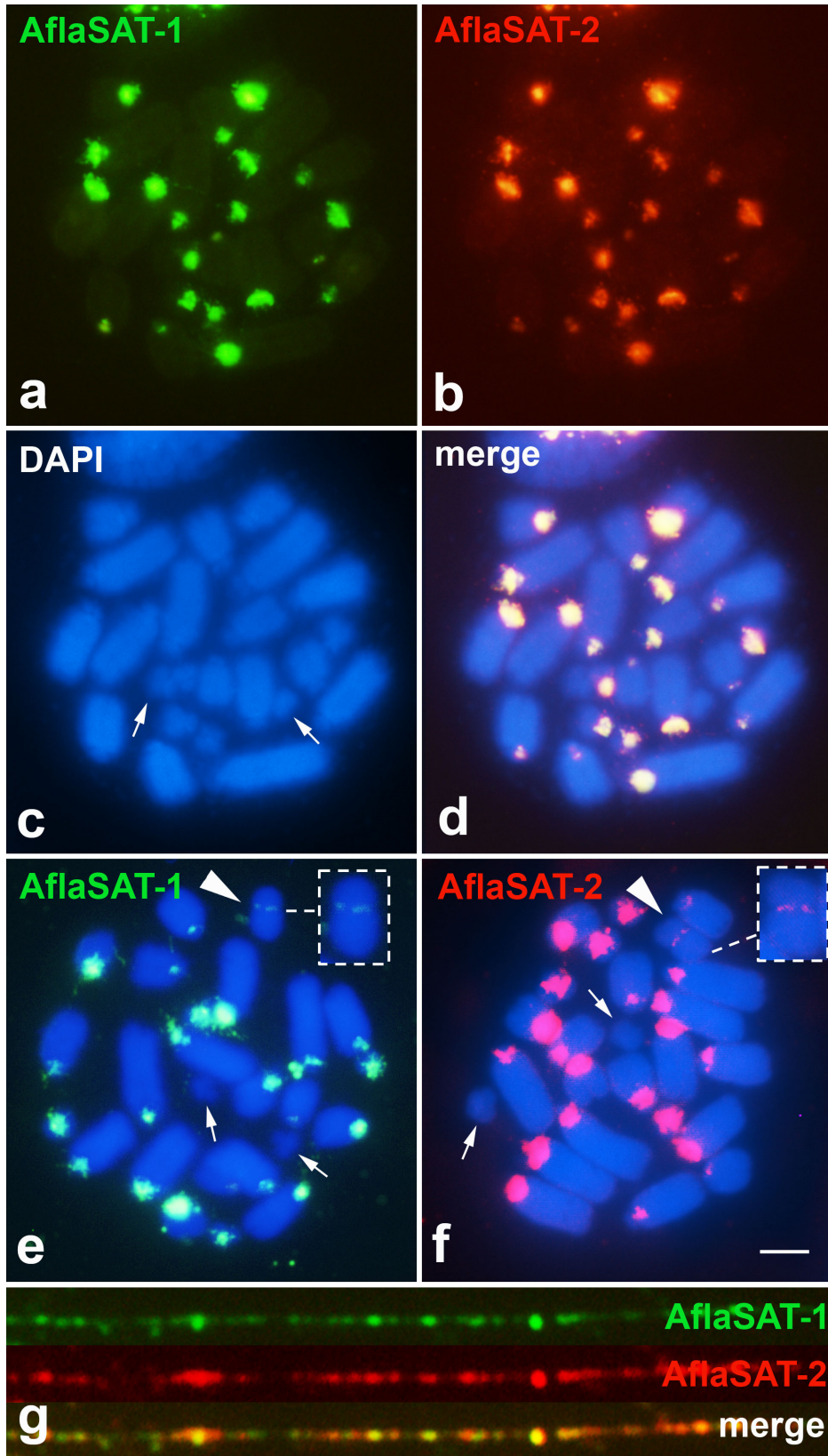


Figure 3

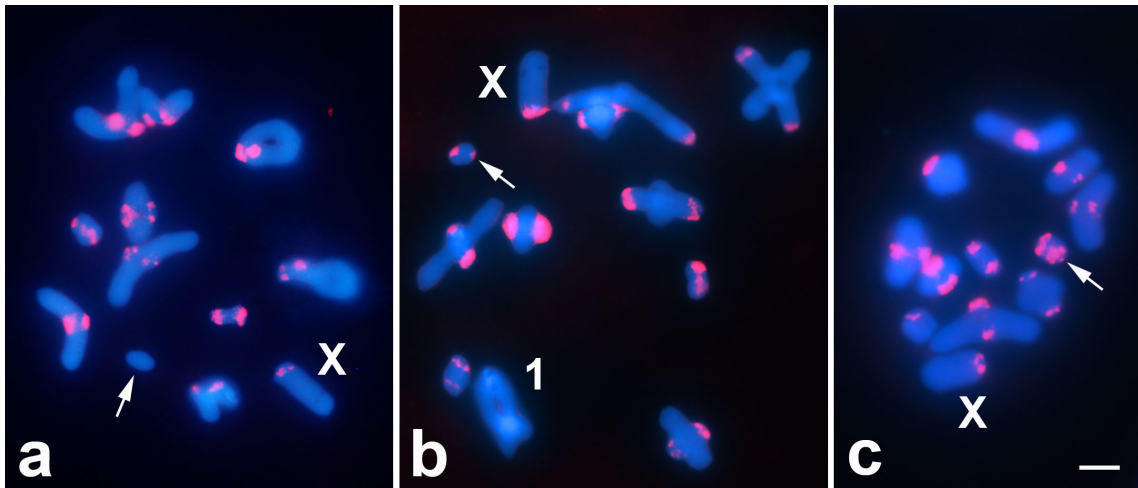


Figure 4

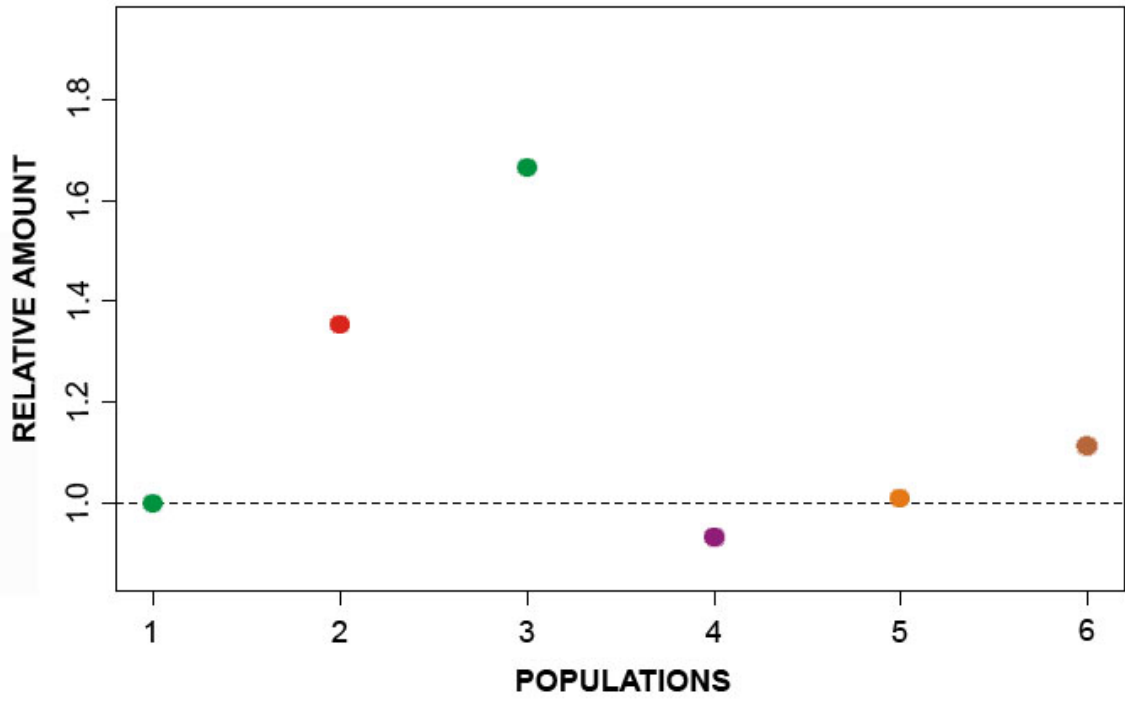


Figure 5

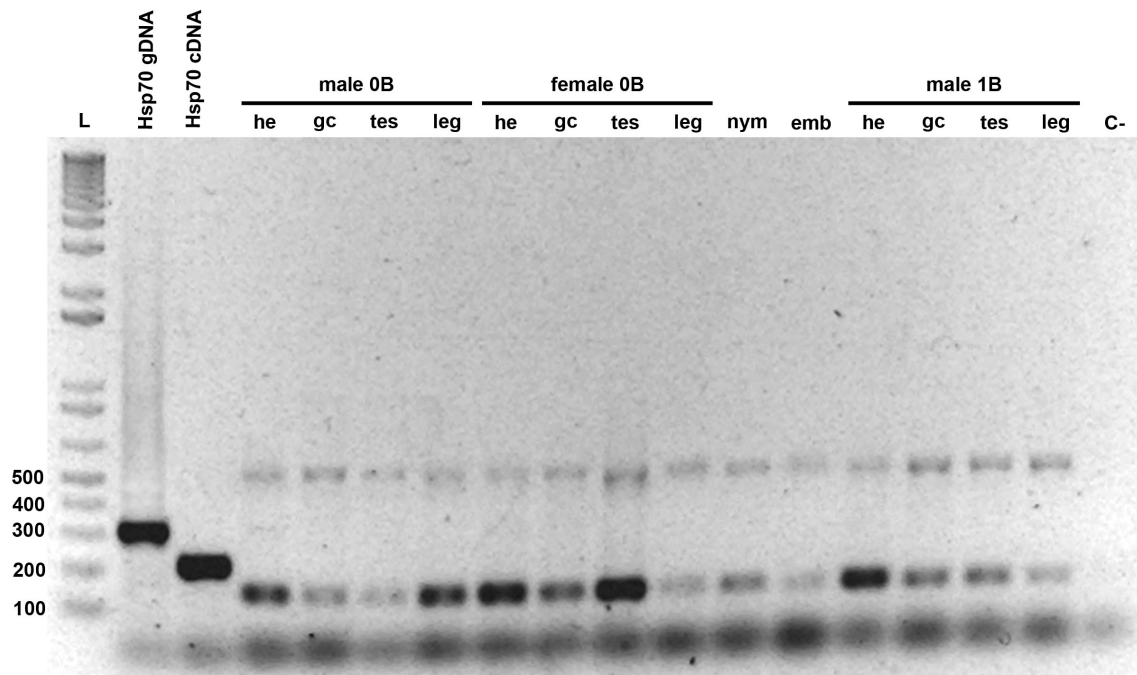
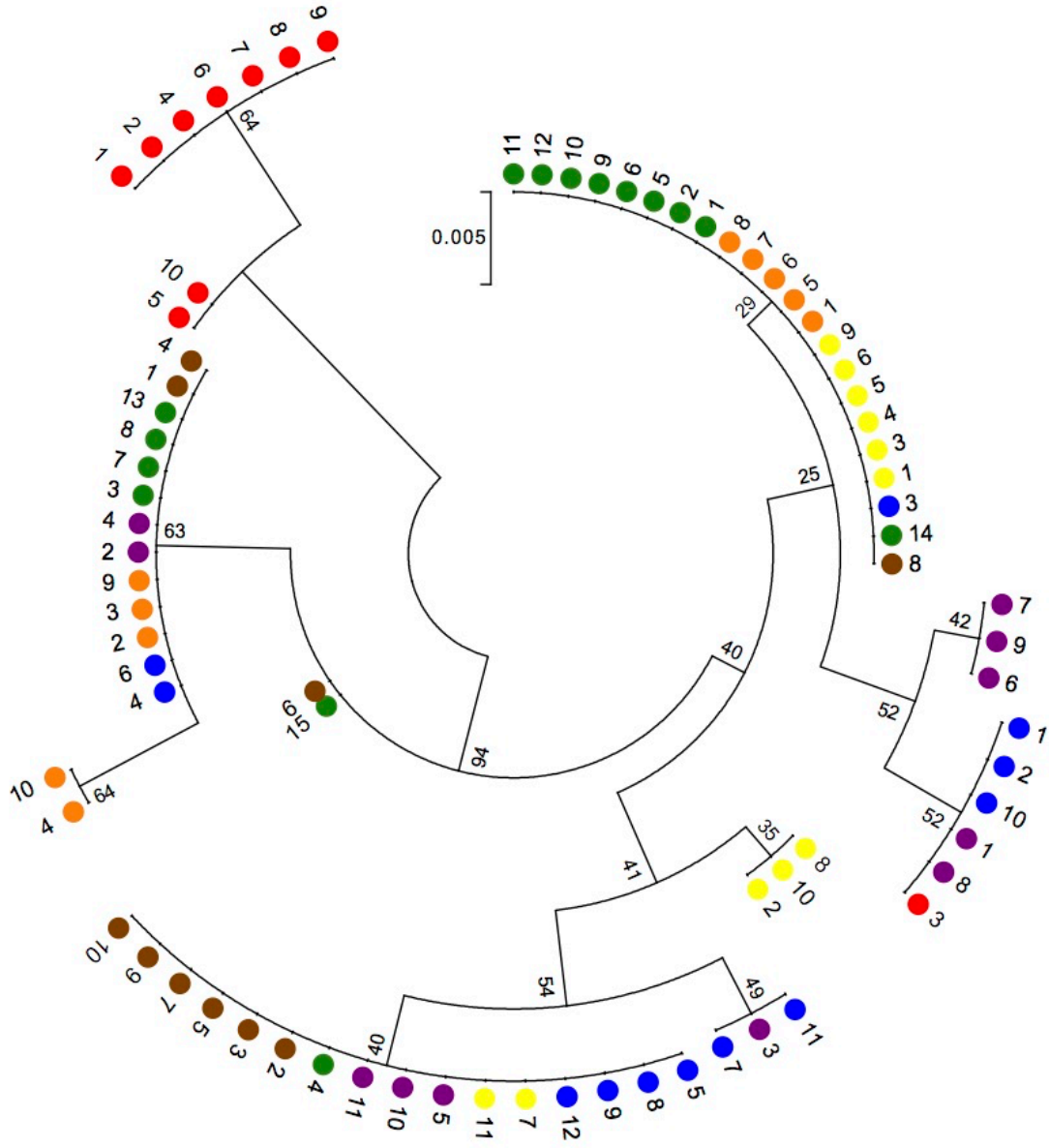


Figure 6

Supplementary material S1.



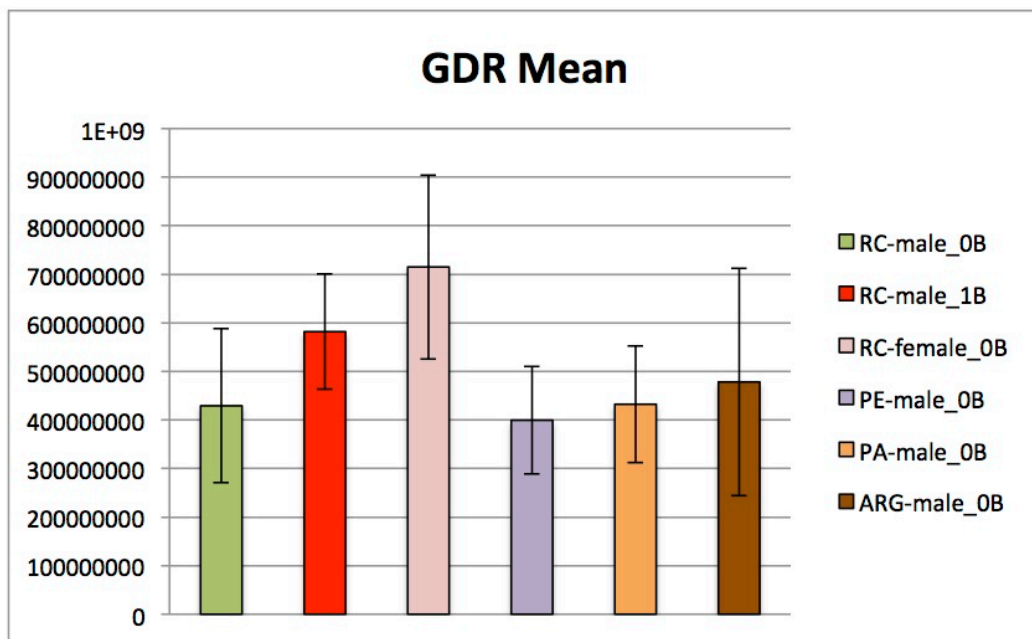
Supplementary material S2.

Sample	Target	Ct	Ct Mean	GDR
RCmale0B-1	Hsp70	33.7905693	33.7081528	
RCmale0B-1	Hsp70	33.6257362		304891579
RCmale0B-1	SAT	5.48640203	5.52443171	
RCmale0B-1	SAT	5.56246138		
RCmale0B-2	Hsp70	34.1192551	34.0144043	
RCmale0B-2	Hsp70	33.9095535		636693754
RCmale0B-2	SAT	4.81726694	4.76837993	
RCmale0B-2	SAT	4.71949291		
RCmale0B-3	Hsp70	33.3044014	33.5037003	
RCmale0B-3	Hsp70	33.7029991		469686752
RCmale0B-3	SAT	4.50689697	4.6965766	
RCmale0B-3	SAT	4.88625622		
RCmale0B-4	Hsp70	33.8142281	33.8960285	
RCmale0B-4	Hsp70	33.977829		305477982
RCmale0B-4	SAT	5.90988541	5.70953536	
RCmale0B-4	SAT	5.50918531		
RCmale1B-1	Hsp70	33.9757195	33.9166412	
RCmale1B-1	Hsp70	33.857563		590670777
RCmale1B-1	SAT	5.03009272	4.77886224	
RCmale1B-1	SAT	4.52763176		
RCmale1B-2	Hsp70	33.4022312	33.6397524	
RCmale1B-2	Hsp70	33.8772736		627472926
RCmale1B-2	SAT	4.5054884	4.41477442	
RCmale1B-2	SAT	4.32406044		
RCmale1B-3	Hsp70	33.9734993	33.5335503	
RCmale1B-3	Hsp70	33.0936012		416033764
RCmale1B-3	SAT	4.8587842	4.90142488	
RCmale1B-3	SAT	4.94406557		
RCmale1B-4	Hsp70	34.4621315	34.5517883	
RCmale1B-4	Hsp70	34.6414452		693022705
RCmale1B-4	SAT	5.13265705	5.18346095	
RCmale1B-4	SAT	5.23426485		
RCfemale0B-1	Hsp70	34.6044159	34.6857243	
RCfemale0B-1	Hsp70	34.7670326		548463680
RCfemale0B-1	SAT	5.80280685	5.65490341	
RCfemale0B-1	SAT	5.50699997		
RCfemale0B-2	Hsp70	35.036396	35.1127872	
RCfemale0B-2	Hsp70	35.1891785		672860519
RCfemale0B-2	SAT	5.73476648	5.78705502	
RCfemale0B-2	SAT	5.83934355		
RCfemale0B-3	Hsp70	35.8085899	35.5810471	
RCfemale0B-3	Hsp70	35.3535042		987572105
RCfemale0B-3	SAT	5.75750351	5.70173621	

RCfemaleOB-3	SAT	5.64596891	
RCfemaleOB-4	Hsp70	34.2170486	34.4179115
RCfemaleOB-4	Hsp70	34.6187744	651266463
RCfemaleOB-4	SAT	5.19220257	5.13923883
RCfemaleOB-4	SAT	5.0862751	
PEmaleOB-1	Hsp70	34.6948624	34.6018238
PEmaleOB-1	Hsp70	34.5087852	313695921
PEmaleOB-1	SAT	6.45853186	6.37703228
PEmaleOB-1	SAT	6.2955327	
PEmaleOB-2	Hsp70	34.1072731	34.1964455
PEmaleOB-2	Hsp70	34.2856178	350696380
PEmaleOB-2	SAT	5.91307592	5.81079817
PEmaleOB-2	SAT	5.70852041	
PEmaleOB-3	Hsp70	34.1752968	34.1862106
PEmaleOB-3	Hsp70	34.1971245	562225303
PEmaleOB-3	SAT	5.24635935	5.11963749
PEmaleOB-3	SAT	4.99291563	
PEmaleOB-4	Hsp70	35.0756569	34.7389107
PEmaleOB-4	Hsp70	34.4021645	371231986
PEmaleOB-4	SAT	6.28755903	6.27116489
PEmaleOB-4	SAT	6.25477076	
PAmaleOB-1	Hsp70	34.828186	34.7295418
PAmaleOB-1	Hsp70	34.6308975	437388335
PAmaleOB-1	SAT	5.99807119	6.02520227
PAmaleOB-1	SAT	6.05233335	
PAmaleOB-2	Hsp70	33.2278061	33.2214546
PAmaleOB-2	Hsp70	33.2151031	273038873
PAmaleOB-2	SAT	5.36251783	5.19692349
PAmaleOB-2	SAT	5.03132915	
PAmaleOB-3	Hsp70	33.6362915	33.6747322
PAmaleOB-3	Hsp70	33.7131729	455076465
PAmaleOB-3	SAT	4.91471338	4.91319847
PAmaleOB-3	SAT	4.91168356	
PAmaleOB-4	Hsp70	34.602108	34.7005825
PAmaleOB-4	Hsp70	34.799057	564035832
PAmaleOB-4	SAT	5.71513987	5.62937093
PAmaleOB-4	SAT	5.54360199	
ARGmaleOB-1	Hsp70	33.2722244	33.3410988
ARGmaleOB-1	Hsp70	33.4099731	303005889
ARGmaleOB-1	SAT	5.29783773	5.16632819
ARGmaleOB-1	SAT	5.03481865	
ARGmaleOB-2	Hsp70	34.1698952	33.8580914
ARGmaleOB-2	Hsp70	33.5462875	439227660
ARGmaleOB-2	SAT	5.29600191	5.14769769
ARGmaleOB-2	SAT	4.99939346	

ARGmaleOB-3	Hsp70	34.5811195	34.3560562	
ARGmaleOB-3	Hsp70	34.1309929		819646135
ARGmaleOB-3	SAT	4.79001045	4.74563026	
ARGmaleOB-3	SAT	4.70125008		
ARGmaleOB-4	Hsp70	33.9569473	33.8126411	
ARGmaleOB-4	Hsp70	33.668335		351505331
ARGmaleOB-4	SAT	5.27178621	5.42366982	
ARGmaleOB-4	SAT	5.57555342		

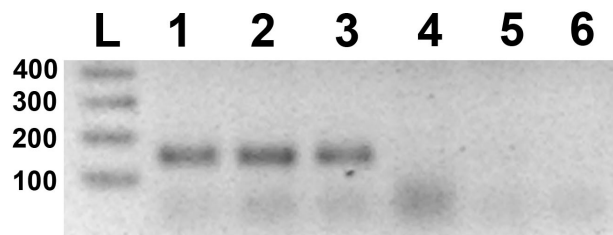
Sample	GDR Mean	SD
RC-male_OB	429187516.9	158590200.9
RC-male_1B	581800043.2	118340810.1
RC-female_OB	715040691.9	189620314.9
PE-male_OB	399462397.4	111089652.4
PA-male_OB	432384876.5	120087559.2
ARG-male_OB	478346253.6	234413264.8



Supplementary material S3.



a



b

	1	10	20	30	40	50	60
Abracris flavolineata	GACAGTTTTAAACACTTCCATTACAGAGTGTGTCGCCTT	CTTCGAATC	TGAGGTTA	-GGCAG			
Abracris dilecta	GACAGTTTTAAACACTTCCATTACAGAGTGTGTCGCCTT	CATTTCGAATC	TGAGGTTA	AGGCAG			
Vilerna rugulosa	GACAGTTTTAAACACTTCCATTACAGAGTGTGTCGCCTT	CATTTCGAATC	TGAGGTTA	AGGCAG			
Ronderosia bergi	GACAGTTTTAAACACTTCCATTACAGAGTGTGTCGCCTT	ATTTCGAATC	CTGAGGTTA	-GGCAG			
	70	80	90	100	110	120	
Abracris flavolineata	G AACCCG-AAGAGGACA	CCGTCATTCAAATTAACGTCCTAAACGCGCCGTCTACGACTGTGT					
Abracris dilecta	GAACCCGAAAGAGGACA	CCGTCATTCAAATTAACGTCCTAAACGCGCCGTCTACGACTGTGT					
Vilerna rugulosa	G AACCCGAAAGAGGACA	CCGTCATTCAAATTAACGTCCTAAACGCGCCGTCTACGACTGTGT					
Ronderosia bergi	G AACCCG-AAGAGGACA	ACC	CCGTCATTCAAATTAACGTCCTAAACGCGCCGTCTACGACTGTGT				
	130	140	143				
Abracris flavolineata	TGATA TCCAATAACA						
Abracris dilecta	TGATA TCCAATAACA						
Vilerna rugulosa	TGATA TCCAATAACA						
Ronderosia bergi	TGATA TCCAATAACA						

c

5. CONCLUSÕES FINAIS

- O compartilhamento do AflaSAT-1 com pelo menos mais três espécies de gafanhotos está de acordo com a “hipótese da biblioteca de DNAsat”, indicando um possível ponto de origem para esta sequência antes da divergência das subfamílias Ommatolampidina e Melanoplinae;
- a discrepância de variabilidade observada para os dois DNAs repetitivos presentes no cromossomo B (AflaSAT-1 e U2 snDNA) sugere que esse cromossomo não governa sozinho o destino evolutivo das sequências que abriga, conduzindo à acumulação ou não de mutações dependendo também da possível função da sequência no genoma;
- o DNAsat AflaSAT-1 sofreu processos de expansão ou eliminação interpopulacionalmente, causando diferenças no número de clusters cromossômicos e cópia desta sequência;
- a observação de distintos arranjos dos satélites AflaSAT-1 e AflaSAT-2 pela análise genômica estrutural e física, indicam uma estrutura mais complexa para este tipo de sequência no genoma de *A. flavolineata*, o qual foi também relatado para outros insetos;
- os dados obtidos da análise cromossômica, juntamente com outros trabalhos já publicados mostraram que o cromossomo B de *A. flavolineata* não apresenta amplificação de sequências heterocromáticas, diferentemente do comumente observado para outras espécies. Isso sugere que este cromossomo pode provavelmente abrigar sequências eucromáticas e possivelmente genes;
- a constitutiva atividade transcricional de AflaSAT-1 notada nos distintos tecidos de adultos, e em distintas fases de desenvolvimento, além de indivíduos abrigando cromossomo B, sugere um possível papel biológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJOS, A.; LORETO, V.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Organization of some repetitive DNAs and B chromosomes in the grasshopper *Eumastusia koebelei koebelei* (Rehn, 1909) (Orthoptera, Acrididae, Leptysminae). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, p. 219-228, 2016
- BAKKALI, M.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in north africa. I. B variants and frequency. **Heredity**, v. 83, p. 428-34, 1999.
- BARROS, A. V.; SCZEPANSKI, T. S.; CABRERO, J. et al. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, v. 322-323, p. 47-50, 2011.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: An impresision of the 1st B-chromosome conference. **Heredity**, v. 73 p 928-996, 1994.
- BIDAU, C. J. Influence of a rare unstable B-chromosome on chiasma frequency and nonhaploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). **Genetica**, v. 73 p. 201-210, 1987.
- BIDAU, C. J.; ROSATO, M.; MARTÍ, D. A. FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distorsion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). **Cytogenet Genome Res**, v. 106, p. 295-301, 2004.
- BISCOTTI, M. A.; CANAPA, A.; FORCONI, M.; OLMO, E.; BARUCCA, M. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. **Chromosome Research**, v. 23, 463-477, 2015b.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015a.
- BRAJKOVIĆ, J.; FELICIELLO, I.; BRUVO-MAĐARIĆ, B.; UGARKOVIĆ, Đ. Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. **G3: Genes Genomes Genetics**, v. 2, p. 931-941, 2012.

BRUVO-MAĐARIĆ, B.; PLOHL, M.; UGARKOVIĆ, D. Wide distribution of related satellite DNA families within the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). **Genetica**, v. 130 p. 35-42, 2007.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PLoS ONE**, v. 8 e66532, 2013.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104 p. 393-400, 2010.

CABRERO, J.; BAKKALI, M.; BUGROV, A.; WARCHALOWSKA-SLIWA, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, v. 112, p. 207-211, 2003.

CABRERO, J.; BAKKALI, M.; NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; RUÍZ-RUANO, F. J.; MARTÍN-BLÁZQUEZ, R.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M. The Ku70 DNA-repair protein is involved in centromere function in a grasshopper species. **Chromosome Research**, v. 21, p. 393-406, 2013.

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; RUÍZ-ESTÉVEZ, M.; GÓMEZ, R.; PETITPIERRE, E.; RUFAS, J. S.; MASSA, B.; KAMEL BEN HALIMA, M.; CAMACHO, J. P. M. B1 was the ancestor B chromosome variant in the western Mediterranean area in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 142 p. 54-8, 2014.

CAMACHO, J. M.; RUIZ-RUANO, F. J.; MARTÍN-BLÁZQUEZ, R.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; LORITE, P.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; BAKKALI, M. A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. **Chromosoma**, v. 124, p. 263-275, 2015.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: The evolution of the genome (Gregory TR, ed.): p. 223-286, 2005.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **Phil Trans R Soc Lond B**, v. 355 p. 163-178, 2000.

CAZAUX, B.; CATALAN, J.; JUSTY, F.; ESCUDÉ, C.; DESMARAIS, E.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Evolution of the structure and composition of house mouse satellite DNA sequences in the subgenus *Mus* (Rodentia: Muridea): a cytogenomic approach. **Chromosoma**, v. 122, p. 209-20, 2013.

CESARI, M.; LUCHETTI, A.; PASSAMONTI, M.; SCALI, V.; MANTOVANI, B. Polymerase chain reaction amplification of the Bag320 satellite family reveals the ancestral library and past gene conversion events in *Bacillus rossius* (Insecta Phasmatodea). **Gene**, v. 312 p. 289-295, 2003.

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

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends Genet**, v. 2 p. 159-165, 1986.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M. Geneious v4.8.5. **Biomatters**, Auckland, New Zeland, 2009.

FANTINATTI, B. E.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G. T.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARTINS, C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**, v. 139, p. 1273-1282, 2011.

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

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS-alfa satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterisation of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, p. 1069-1084, 1977.

GARCÍA, G.; RÍOS, N.; GUTIÉRREZ, V. Next-generation sequencing detects repetitive elements expansion in giant genomes of annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Genetica**, v. 143, p. 353-360, 2015.

GRAPHODATSKY, A. S.; KUKKOVA, A. V.; YUDKIN, D. V. et al. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. **Chromosome Research**, v. 13, p. 113-122, 2005.

GREEN, D. M.; ZEYL, C. W.; SHARBEL, T. F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **J Evol Biol**, v. 6, p. 417-441, 1993.

GREEN, D. M. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, p. 818-824, 1999.

GUTKNECHT, J.; SPERLICH, D.; BACHMANN, L. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**, v. 103, p. 539-544, 1995.

HALL, S. E.; KETTLER, G.; PREUSS, D. Centromere satellites from *Arabidopsis* populations: maintenance of conserved and variable domains. **Genome Res**, v. 13, p. 195-205, 2003.

HEITKAM, T.; PETRASCH, S.; ZAKRZEWSKI, F.; KÖGLER, A.; WENKE, T.; WANKE, S.; SCHMIDT, T. Next-generation sequencing reveals differentially amplified tandem repeats as a major genome component of Northern Europe's oldest *Camellia japonica*. **Chromosome Research**, v. 23, p. 791-806, 2015.

HENIKOFF, S.; MALIK, H. S. Selfish drivers. **Nature**, v. 417, p. 227, 2002.

HOLMES, D. S.; BOUGOURD, S. M. B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. I. Natural populations. **Heredity**, v. 63, p. 83-87, 1989.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, p. 467-478, 2014.

JAMILENA, M.; RUIZ-REJÓN, C.; RUIZ-REJÓN, M. A molecular analysis of the origin of the *Crepis Capillaris* B chromosome. **J Cell Sci**, v. 107, p. 703-708, 1994.

JONES, R. N. Are B chromosomes selfish? In **The evolution of genome size** (ed. T. Cavalier-Smith), v. 30, p. 397-425, 1985.

JONES, R. N. B chromosomes in plants. Tansley review, n. 85, **New Phytol**, v. 131, p. 411-434, 1995.

JONES, R. N.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; VEGA, J. M.; PUERTAS, M. J. Chromosomes with a life of their own. **Cytogenet Genome Res**, v. 120, p. 265-80, 2008.

JONES, R. N.; REES, H. B chromosome. New York: **Academic Press**, 1982.

KAWABE, A.; CHARLESWORTH, D. Patterns of DNA variation among three centromere satellite families in *Arabidopsis halleri* and *A. lyrata*. **J. Mol. Evol**, v. 64, p. 237-247, 2007.

KOPECNA, O.; KUBICKOVA, S.; CERNOHORSKA, H.; CABELOVA, K.; VAHALA, J.; MARTINKOVA, N.; RUBES, J. Tribe-specific satellite DNA in non-domestic Bovidae. **Chromosome Research**, v. 22, p. 277-91, 2014.

KUHN, G. C. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. **Heredity**, v. 115, p. 1-2, 2015.

KUHN, G. C.; FRANCO, F. F.; SILVA JR, W. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; SENE, F. M. On the pBuM189 satellite DNA variability among South American populations of *Drosophila buzzatii*. **Hereditas**, v. 139, p. 161-6, 2003.

KUHN, G. C.; SENE, F. M. Evolutionary turnover of two pBuM satellite DNA subfamilies in the *Drosophila buzzatii* species cluster (repleta group): From alpha to alpha/beta arrays.

Gene, v. 349, p. 77-85, 2005.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIN, C. C.; LI, Y.C. Chromosomal distribution and organization of three cervid satellite DNAs in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*). **Cytogenet Genome Res**, v. 114, p. 147-154, 2006.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dyn.** v. 7, p.1-28, 2012.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; DZYUBENKO, V. V.; BUGROV, A. G.; KARAMYSHEVA, T. V.; RUBTSOV, N. B.; CAMACHO, J. P. M. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 121, p. 260-265, 2008.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S.; HEWITT, G. M.; CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, v. 2, p. 87-92, 1994.

LORETO, V.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M.; SOUZA, M. J. Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species.

Chromosome Research, v. 16, p. 233-241, 2008.

MACAS, J.; NEUMANN, P.; NOVÁK, P.; JIANG, J. Global sequence characterization of rice centromeric satellite based on oligomer frequency analysis in large-scale sequencing data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2101-2108, 2010.

MAKUNIN, A. I.; DEMENTYEVA, P. V.; GRAPHODATSKY, A. S.; VOLOBOUEV, V. T.; KUKKOVA, A. V.; TRIFONOV, V. A. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Mol Cytogenet**, v. 7, p. 99, 2014.

MARQUES, A.; KLEMME, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. **Mol Cytogenet**, v. 5, p. 34, 2012.

MENEZES-DE-CARVALHO, N. Z.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Mol Genet Genomics**, v. 290, p. 1787-92, 2015.

MESTRINER, C. A.; GALETTI, P. M JR.; VALENTINI, S. R.; RUIZ, I. R.; ABEL, L. D.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, v. 85, p. 1-9, 2000.

MEŠTROVIĆ, N.; CASTAGNONE-SERENO, P.; PLOHL, M. Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root-knot nematodes. **Mol Biol Evol**, v. 23, p. 2316-2325, 2006.

MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PLoS ONE**, v. 9, e97956, 2014.

MILANI, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. The U2 snDNA is a Useful Marker for B Chromosome Detection and Frequency Estimation in the Grasshopper *Abracris flavolineata*. **Cytogenetics and Genome Research**, 2017.

MONTIEL, E. E.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. Gypsy, RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. **Genetica**, v. 140, p. 365-74, 2012.

MONTIEL, E. E.; CABRERO, J.; RUIZ-ESTÉVEZ, M.; BURKE, W. D.; EICKBUSH, T. H.; CAMACHO, J. P.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. Preferential occupancy of R2 retroelements on the B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PLoS ONE**, v. 9, e91820, 2014.

MRAVINAC, B.; PLOHL, M.; UGARKOVIĆ, D. Preservation and high sequence conservation of satellite DNAs indicate functional constraints. **J Mol Evol**, v. 61, p. 542-50, 2005.

NERGADZE, S. G.; BELLONI, E.; PIRAS, F. M.; KHORIAULI, L.; MAZZAGATTI, A.; VELLA, F.; BENSI, M.; VITELLI, V.; GIULOTTO, E.; RAIMONDI, E. Discovery and comparative analysis of a novel satellite, EC137, in horses and other equids. **Cytogenet Genome Res**, v. 144, p. 114-23, 2014.

NGUYEN, P.; SÝKOROVÁ, M.; ŠÍCHOVÁ, J.; KŮTA, V.; DALÍKOVÁ, M.; ČAPKOVÁ FRYDRYCHOVÁ, R.; NEVEN, L. G.; SAHARA, K.; MAREC, F. Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, p. 6931–6936, 2013.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformaticis**, v. 11, p. 378, 2010.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAIŠL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, p. 792-793, 2013.

NUR, U.; WERREN, J. H.; EICKBUSH, D. G.; BURKE, W. D.; EICKBUSH, T. H. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**, v. 240, p. 512-514, 1988.

OLIVEIRA, N. L.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; ROCHA, M. F.; LORETO, V.; MARTINS, C.; MOURA, R. C. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive

chromosomal dispersion and colocalization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Mol Cytogenet*, v. 4, p. 24, 2011.

PAÇO, A.; ADEGA, F.; MEŠTROVIĆ, N.; PLOHL, M.; CHAVES, R. Evolutionary story of a satellite DNA from *Phodopus sungorus* (Rodentia, Cricetidae). *Genome Biol Evol*, v. 6, p. 2944-55, 2014.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; BUENO, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of two *Mariner*-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* (orthoptera: Acrididae) reveals enrichment in euchromatin. *Eur J Entomol*, v. 111, p. 329-334, 2014.

PALESTIS, B. G.; CABRERO, J.; TRIVERS, R.; CAMACHO, J. P. M. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. *Genetica*, v. 138, p. 1181-1189, 2010.

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

PEZER, Z. L.; BRAJKOVIĆ, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIĆ, D. Transcription of Satellite DNAs in Insects. *Prog Mol Subcell Biol*, v. 51, p. 161-78, 2011.

PINKEL, D.; LANLEGENT, J.; COLLINS, C.; FUSCOE, J.; SEGRAVES, R.; LUCAS, J.; GRAY, J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 85, p. 9138-42, 1988.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene*, v. 409, p. 72-82, 2008.

POLETTI, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genet*, v. 11, p. 1, 2010.

PROBST, A. V.; OKAMOTO, I.; CASANOVA, M.; EL MARJOU, F.; LE BACCON, P.; ALMOUZNI, G. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. **Dev Cell**, v. 19, p. 625-38, 2010.

PUERTAS, M. J. Nature and evolution of B chromosomes in plants: A noncoding but information-rich part of plant genomes. **Cytogenet Genome Res**, v. 96, p. 198-205, 2002.

RUIZ-ESTÉVEZ, M.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* are present in all body parts analyzed and show extensive variation for rDNA copy number. **Cytogenet Genome Res**, v. 143, p. 268-74, 2014.

RUIZ-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. Ribosomal DNA is active in different B chromosome variants of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genetica**, v. 141, p. 337-45, 2013.

RUIZ-RUANO, F. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

RUIZ-RUANO, F. J.; CUADRADO, Á.; MONTIEL, E. E.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. **Chromosoma**, v. 124, p. 221-234, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. US. v. 1, 2001.

SHAW, M. W.; HEWITT, G. M. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next? In **Oxford Surveys in Evolutionary Biology** (*D. Futuyma y J. Antonovics (eds.)*), v. 7, p. 197-223, 1990.

SILVA, D. M. Z. DA.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.;

CAMACHO, J. P. M.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS ONE**, v. 9, e94896, 2014.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; MONTIEL, E. E.; ACOSTA, M. J.; SÁNCHEZ, A.; CAMACHO, J. P. M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, v. 17, p. 11-8, 2009b.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; ACOSTA, M. J.; SÁNCHEZ, A.; CAMACHO, J. P. M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 125, p. 286-291, 2009a.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the Migratory locust. **Chromosoma**, v. 119, p. 217-225, 2010.

TERUEL, M.; RUÍZ-RUANO, F. J.; MARCHAL, J. A.; SÁNCHEZ, A.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; PERFECTTI, F. Disparate molecular evolution of two types of repetitive DNAs in the genome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v. 112, p. 531-42, 2013.

TERUEL, M.; SØRENSEN, J. G.; LOESCHCKE, V.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Level of heat shock proteins decreases in individuals carrying B-chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 132, p. 94-9, 2011.

TOPP, C. N.; ZHONG, C. X.; DAWE, R. K. Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101 p. 15986-15991, 2004.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN, P. C.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GRAPHODATSKY, A. S. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biol**, v. 11, p. 90, 2013.

- TSOUMANI, K. T.; DROSOPOULOU, E.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.;
MATHIOPOULOS, K. D. Molecular characterization and chromosomal distribution of a
species-specific transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly, *Bactrocera*
oleae. **PLoS ONE**, v. 8, e79393, 2013.
- UGARKOVIĆ, D. Functional elements residing within satellite DNAs. **EMBO Rep**, v. 6, p.
1035-1039, 2005.
- UGARKOVIĆ, D. Satellite DNA libraries and centromere evolution. **Open Evol J**, v. 2, p.1-
6.
- UGARKOVIĆ, D. Centromere-competent DNA: structure and evolution. **Prog Mol Subcell**
Biol, v. 48, p. 53-76, 2009.
- UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects.
EMBO J, v. 21, p. 5955-5959, 2002.
- VALENTE, G. T.; CONTE, M. A.; FANTINATTI, B. E.; CABRAL-DE-MELLO, D.
C.; CARVALHO, R. F.; VICARI, M. R.; KOCHER, T. D.; MARTINS, C. Origin and
Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on
Integrated Genomic Analyses. **Mol Biol Evol**, v. 31, p. 2061-72, 2014.
- VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; FANTINATTI, B. E. A.; MARQUES, D.;
ALMEIDA, R. O.; SIMÕES, R. F.; MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to
systems biology. **Chromosoma**, p. 1-9, 2016.
- VERSHININ, A.V.; ALKHIMOVA, E.G.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular
diversification of tandemly organised sequences and heterochromatic chromosome regions in
some *Triticeae* species. **Chromosome Research**, v. 4, p. 517-525, 1996.
- VICARI, M. R.; PISTUNE, H. F. DE M.; CASTRO, J. P.; DE ALMEIDA, M. C.;
BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O.; CAMACHO, J. P.; ARTONI, R. F. New

insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, p. 1073-81, 2011.

VITTORAZZI, S. E.; QUINDERÉ, Y. R.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; TOMATIS, C.; BALDO, D.; LIMA, J. R.; FERRO, J. M.; LIMA, J. D.; LOURENÇO, L. B. Comparative cytogenetics of *Physalaemus albifrons* and *Physalaemus cuvieri* species groups (Anura, Leptodactylidae). **Comp Cytogenet**, v. 8, p. 103-23, 2014.

WEBB, G. C.; WHITE, M. J. D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the parthogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. **Chromosoma**, v. 67, p. 309-339, 1978.

WILSON, E. B. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science**, v. 26, p. 870-871, 1907.

ZIEGLER, C. G.; LAMATSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, p. 23-35, 2003.