
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

ESTUDO DE MECANISMOS EVOLUTIVOS ENVOLVENDO
SEQUÊNCIAS REPETITIVAS PRESENTES NO GENOMA DE
ESPÉCIES DE *PROCERATOPHRYS* (AMPHIBIA,
ODONTOPHRYNIDAE)

RAQUEL FOGARIN DESTRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro - SP
2022

RAQUEL FOGARIN DESTRO

ESTUDO DE MECANISMOS EVOLUTIVOS ENVOLVENDO SEQUÊNCIAS
REPETITIVAS PRESENTES NO GENOMA DE ESPÉCIES DE
PROCERATOPHRYS (AMPHIBIA, ODONTOPHRYNIDAE)

Orientadora: Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro -SP
2022

D477e

Destro, Raquel Fogarin

Estudo de mecanismos evolutivos envolvendo sequências repetitivas presentes no genoma de espécies de Proceratophrys (Amphibia, Odontophrynidae) / Raquel Fogarin Destro. -- Rio Claro, 2022

47 f. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

1. Anfíbio Evolução. 2. Genômica. 3. Genética molecular. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

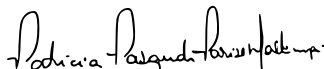
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo de mecanismos evolutivos envolvendo sequências repetitivas presentes no genoma de espécies de Proceratophrys (Amphibia, Odontophrynidae)

AUTORA: RAQUEL FOGARIN DESTRO

ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Profa. Dra. JOSIANE BACCARIN TRALDI (Participação Virtual)
Departamento de Genética / Universidade Federal do Amazonas

Rio Claro, 23 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha mãe, Márcia e ao meu pai, Marcelo que apesar de todas as dificuldades e distancia me apoiaram com muito amor e carinho, imprescindíveis nesta jornada. Ao meu irmão, Fábio, por todas as conversas amigas e de força.

Agradeço, a Professora Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempo, por sua orientação, ensinamentos, incentivos, apoio, por sempre estar disposta a escutar diante das aflições deste período e me orientando com dedicação.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório Me. Marcelo João da Silva, online no período de pandemia, e companheiro de RU agora na volta do presencial, sou grata a todo o apoio que me deu neste trabalho, que sempre me ajudou nos momentos difíceis com palavras amigas e de incentivo. Marcelo, muito obrigada, mesmo.

Todos as companheiras e companheiros de laboratório, que estão, ou que já estiveram, Murilo, Carol, Luiza, Matheus, Lucianda, Evelin, por todas as conversas, crises e alegrias divididas tanto no período online, quanto agora no presencial. Obrigada por sempre me escutarem nos momentos difíceis de experimentos que não davam certo ou nos momentos de comemorações.

Agradeço também a todas as amigas e amigos que estiveram comigo nesses anos, vivemos e estamos vivendo uma pandemia que não foi nada fácil, mas que com muitos desabafos misturados com momentos de alegria tornaram essa jornada menos sufocante, e ao meu companheiro de jornada Nicolas, que sempre esteve nos momentos difíceis com muito amor, carinho e paciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Tudo o que você fizer na vida será insignificante, mas é muito importante que você faça,
porque ninguém mais o fará.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Estudos recentes têm mostrado que DNAs satélites exercem importantes papéis biológicos, como a participação na organização dos centrômeros e na modulação da expressão gênica, em diversos organismos. O avanço e a modernização de tecnologias de sequenciamento genômico junto com ferramentas de bioinformática têm fornecido um aumento de informações sobre a organização, localização, número de cópias, tamanho de repetições, variabilidade de repetição, papel funcional e evolução de sequências repetitivas. Trabalhos que combinam essas análises com técnicas de biologia molecular vêm contribuindo para a compreensão de mecanismos evolutivos que possam estar ocorrendo dentro de grupos filogeneticamente relacionados. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar se sequências de DNAs satélites, previamente encontradas no genoma de *Proceratophrys boiei* são compartilhadas entre espécies filogeneticamente relacionadas desse gênero e em caso afirmativo, se seguiam mecanismos evolutivos propostos para este tipo de sequência. As análises foram realizadas com base no sequenciamento genômico e análises de bioinformática visando a caracterização, mapeamento e análises de sequências em três espécies do gênero: *Proceratophrys schirchi*, *Proceratophrys melanopogon* e *Proceratophrys laticeps*. Como resultado, este estudo mostrou a presença do DNA satélite PboSat2-173 nas três espécies de *Proceratophrys*, com variação quanto à abundância e divergência de sequência nas diferentes espécies e com localização centromérica em todos os cromossomos de *P. melanopogon* e *P. laticeps* e nenhum sinal de hibridização para *P. schirchi*. O satélite PboSat3-189 também se mostrou presente nas espécies estudadas, no entanto, com localização espécie-específica e variação quanto à abundância e divergência de sequência. O resultado para ambos os satélites estudados corrobora então com o proposto pela hipótese da biblioteca para evolução de sequências de DNAs satélites.

Palavras-chaves: Citogenética, *RepeatExplorer*, Hibridização *in situ*, Evolução.

ABSTRACT

Recent studies have shown that satellite DNA plays important biological roles, such as participation in the organization of centromeres and in modulation of gene expression in different organisms. The advancement in sequencing technologies combined with bioinformatics tools has provided a wealth of information about repetitive sequence organization, location, number of copies, size of repetitions, variability of repetition, functional role and evolution. Studies that combine these analyses, alongside molecular genetic techniques, have contributed to the knowledge of evolutionary mechanisms that may be occurring within phylogenetically related groups. Therefore, the present study aimed to investigate if satellites DNAs previously found in the genome of *Proceratophrys boiei* are shared among phylogenetically related species of this genus, and if so, whether they follow evolutionary patterns proposed for this type of sequences, this, through genomic sequencing and bioinformatics analysis, with characterization, mapping and sequence analysis, these species being: *Proceratophrys schirchi*, *Proceratophrys melanopogon* e *Proceratophrys laticeps*. Thus, this study uncovered the presence of satellite DNA – PboSat2-173 - in all three species studied, however, with variation in abundance and sequence divergence. Mapping by FISH technique in *P. melanopogon* e *P. laticeps* showed centromeric location in all chromosome's pairs, but in *P. schirchi* no hybridization signal was found. The satellite PboSat3-189 it is also shared between all three species with variation in abundance and sequence divergence, however, with specie-specific chromosome location. Our results for both studied satellites therefore corroborate in what is proposed by the library hypothesis for the evolution of satellite DNA sequences.

Key-words: Cytogenetics, RepeatExplorer, *In situ* Hybridization, Evolution.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	9
1.1-Considerações gerais sobre sequências repetitivas.....	9
1.2-Considerações sobre o gênero <i>Proceratophrys</i>	12
2.OBJETIVOS.....	15
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1-Material.....	16
3.2-Extração de DNA.....	17
3.3-Sequenciamento genômico.....	17
3.3.1-Characterização do satelitoma.....	18
3.3.2-Busca pelas sequências caracterizadas para <i>P. boiei</i>	18
3.3.3-Cálculo da abundância e divergência estimada para os satDNAs caracterizados de <i>P. boiei</i> entre as espécies de <i>Proceratophrys</i>	19
3.4-Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	19
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1.Manuscrito: Repetitive sequences shared in <i>Proceratophrys</i> species according to the library hypothesis of satellite DNA evolution.....	21
5.CONCLUSÕES GERAIS.....	41
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre sequências repetitivas

Sequências repetitivas vêm sendo estudadas desde o início da década de 60, quando em estudos realizados por Kit (1961) e Seuoka (1961), foram reveladas bandas de DNAs diferentes por densidade/gradiente de ultracentrifugação com cloreto de Césio em espécie de roedor, revelando assim a existência de sequências de DNA específicas que estariam repetidas em grande quantidade no genoma do espécime estudado (GARRIDO-RAMOS, 2017). Assim, o termo “DNA Satélite” foi designado para descrever esse DNA, com composição de pares de bases diferente o suficiente do DNA genômico restante, que forma bandas separadas do DNA total (KIT, 1961; THAKUR *et al.*, 2021).

Por meio da análise de C0t, Britten e Kohne (1968), mostraram que 10% do genoma de ratos estudados correspondia a DNAs satélites (DNAsats), indicando que sequências repetitivas poderiam constituir uma porcentagem significativa do genoma de eucariotos. Já Singer (1982) estudou essas sequências por experimentos com endonucleases de restrição em DNA genômico. Essas técnicas, eficientes na época, mas dispendiosas e de custo elevado e, com o avanço da tecnologia, hoje, são substituídas eficientemente por análises de dados de sequenciamento genômico em conjunto com programas de bioinformática (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013, 2020).

A partir desses estudos, elementos repetitivos encontrados em genomas de eucariotos foram classificados de acordo com suas características, podendo estar dispersos nos genomas, como transposons/retrotransposons e algumas famílias gênicas, ou arranjados em tandem, como DNAs ribossômicos, famílias gênicas codificantes de proteínas, DNAs satélites, DNA centromérico e telomérico (JAILLON, 2004; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012, GARRIDO-RAMOS, 2015; WEI *et al.*, 2014; BISCOTTI *et al.*, 2015).

Dados de sequenciamento genômico analisados por programas de bioinformática, em conjunto com a reação em cadeia da polimerase (PCR), *Southern blot* e hibridização *in situ*, têm fornecido uma riqueza de informações sobre a organização e localização, número de cópias, tamanho de repetições, variabilidade, papel funcional e evolução dessas sequências repetitivas em espécies filogeneticamente relacionadas (PEZER *et al.*, 2011; QUESADA DEL BOSQUE *et al.*, 2013; PLOHL *et al.*, 2014; GARRIDO-RAMOS, 2017).

Para estudos com Sequenciamento de Alto Rendimento (NGS) são desenvolvidas *pipelines* eficientes, como o *RepeatExplorer* (RE) (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013), *Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN) (NOVÁK *et al.*, 2017) e *satMiner* (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016), que possibilitam a identificação *de novo* de sequências repetitivas de DNA em espécies sem um genoma de referência (RUIZ-RUANO *et al.* 2016, 2018; MILANI *et al.*, 2018; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2018, 2020; UTSUNOMIA *et al.*, 2019; BARDELLA *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2020; CREPALDI *et al.*, 2020, 2021; FERRETTI *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

O desenvolvimento dessas ferramentas abre caminhos para a descoberta mais detalhada da evolução de DNAsats e de ‘*insights*’ sobre as diversas famílias de sequências repetitivas em um dado genoma, como suas abundâncias relativas, variabilidade e seus papéis funcionais em diferentes processos genéticos e genômicos (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013; GARRIDO-RAMOS, 2017). Essas novas abordagens também contribuem para o desenvolvimento de estudos genômicos comparativos e filogenômicos (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013; GARRIDO-RAMOS, 2017).

O programa *RepeatExplorer2* (NOVÁK *et al.*, 2020) por exemplo, utiliza um algoritmo de *clusterização* baseado em similaridade que avalia “todas-com-todas” sequências em comparação com as leituras *shot-gun* de todo o genoma sequenciado. Assim, esse algoritmo representa os *reads* e a similaridade das sequências através dos vértices e as conexões destes respectivamente, em um gráfico virtual, e identifica a leitura dos *clusters* examinando a topologia do gráfico gerado. As representações gráficas dizem respeito a organização genômica e a variabilidade dos *repeats*, sendo que estruturas lineares correspondem majoritariamente a elementos transponíveis e estruturas circulares ou globulares a sequências em tandem, como DNAsats (NOVÁK *et al.*, 2017, 2020).

A ferramenta TAREAN (NOVÁK *et al.*, 2017) foi integrada ao programa *RepeatExplorer2* (NOVÁK *et al.*, 2020) e realiza a identificação automática de DNAsats a partir da topologia do gráfico gerado para dado *cluster*. O resultado se mostra no *output* do programa com uma lista contendo os possíveis DNAsats e sua respectiva sequência consenso, que é construída a partir da fragmentação dos *reads* em *k-mers* e as frações dos *k-mers* mais frequentes são utilizadas para a reconstrução da sequência monomérica mais representativa para cada satélite (NOVÁK *et al.*, 2020).

Sabe-se que DNAsats são importantes componentes cromossômicos, uma vez que participam de papéis biológicos, como na organização dos centrômeros e telômeros, na modulação da expressão gênica, na diferenciação de cromossomos sexuais, no aumento dos genomas, dentre outros (PLOHL *et al.*, 2012, 2014; GARRIDO-RAMOS, 2015; UGARKOVIĆ, 2021). Porém, mesmo com o avanço tecnológico e consequente aumento no conhecimento, estes elementos continuam sendo uma enigmática parte do genoma de eucariotos (GARRIDO-RAMOS, 2015; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012; PLOHL *et al.*, 2012; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016, 2018).

Diversos mecanismos estão envolvidos na complexidade, homogeneidade, tamanho monomérico e rápida evolução das sequências do tipo DNA satélite (THAKUR *et al.*, 2021). O modelo da biblioteca de DNAs satélites mostra espécies relacionadas compartilhando um conjunto ancestral de famílias de DNAsats conservadas, que também estaria presente em um ancestral comum (FRY e SALSER, 1977; MESTROVIC *et al.*, 1998). Entretanto, cada uma destas sequências pode estar amplificada em taxas desiguais nas diferentes espécies (GARRIDO-RAMOS, 2017; THAKUR *et al.*, 2021).

Uma vez que uma família de DNAsat é dispersa em um genoma, como foi sugerido, por exemplo, por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016), cada segmento constituindo os diferentes *loci* de DNAsats poderia sofrer evoluções independentes e divergirem uma das outras dentro do genoma da espécie. Mas diferente do esperado, membros de uma família de DNAsat revelam geralmente uma divergência relativamente baixa, assim passam por evolução não-independente em que mutações não são acumuladas em um único monômero, mas sim são propagadas nas unidades monoméricas de um DNAsat ou são eliminadas, esse modelo evolutivo é chamado de “evolução em concerto” (DOVER, 1982; PLOHL *et al.*, 2012).

Em trabalho Dover (1982) argumenta que a homogeneização de DNAsats nos cromossomos na evolução em concerto ocorre por um mecanismo de dois níveis chamado “*molecular drive*”, sendo que no primeiro nível as mutações são passadas ao longo dos monômeros por mecanismos de transferência não-recíprocos que envolvam os sítios portadores desta sequência, como *crossing-over* desigual, transposições ou reinserções de cromossomos extras replicados junto de conversão gênica e, em um segundo nível, essas mutações então são fixadas dentro de um grupo de organismos ligados reprodutivamente (DOVER, 1982, 2002; UGARKOVIĆ e PLOHL *et al.*, 2012; GARRIDO RAMOS, 2017).

O aumento no número de dados nos últimos anos que abordam estrutura, localização e variabilidade dos DNAsats se deu em diferentes organismos como pode ser visto em trabalhos envolvendo invertebrados (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016, BARDELLA *et al.*, 2020 CABRAL-DE MELLO, *et al.*, 2021; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2018, 2020; FERRETTI *et al.*, 2020; MILANI *et al.*, 2021), vertebrados (SILVA *et al.*, 2017; CREPALDI *et al.*, 2020, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2021) e plantas (RUIZ-RUANO, 2018; MATA-SUCRE *et al.*, 2020 MCCANN *et al.*, 2020; KUO *et al.*, 2021).

No caso de anfíbios, o conhecimento sobre essas sequências pode ainda ser considerado pequeno, concentrando-se em dados gerados por tratamento com enzimas de restrição e isolamento das sequências por PCR (VITTORAZZI *et al.*, 2011, 2014, 2021; GATTO *et al.*, 2016, 2018, 2021; BUENO *et al.*, 2021; GUZMÁN *et al.*, 2022) e, mais recentemente, por meio de análises de dados de sequenciamento genômico e bioinformática. Em trabalho Da Silva e colaboradores (2020) revelam pela primeira vez um grande número de DNAs satélites no genoma do sapo *Proceratophrys boiei*. Os resultados desta análise mostraram a presença de 28 famílias de DNAsats na espécie, e três delas, foram mapeadas por hibridização *in situ*, estando localizadas na região heterocromática centromérica e pericentromérica dos cromossomos na espécie. Além disso, uma destas sequências - PboSat3-189 - revelou similaridade com sequências de clones do satélite PcP190, isolado da espécie de anuro *Physalaemus cuvieri* por Vittorazzi e colaboradores (2011), assim esta sequência está compartilhada entre alguns gêneros de anuros, o que mostra a importância de estudos evolutivos para sequências de DNAs satélites em anfíbios anuros.

1.2 Considerações sobre o gênero *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920

O gênero *Proceratophrys* pertence à família Odontophrynidae e é constituído por representantes de sapos de pequenos e médio porte, atualmente formado por 43 espécies, distribuídas no leste e sul do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai, sendo encontradas em ambientes florestais e áreas abertas (PRADO e POMBAL, 2008; FROST, 2022). Contudo, o gênero tem sua riqueza subestimada em relação ao número de espécies, como indicado pela constante descoberta/descrição de novas espécies e revalidações recentes (PRADO e POMBAL, 2008; MARTINS; GIARETTA, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; GODINHO *et al.*, 2013; MARTINS e GIARETTA, 2013; MÂNGIA *et al.*,

2014; MÂNGIA *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2020; MÂNGIA *et al.*, 2020; SANTANA, *et al.*, 2021).

A taxonomia e sistemática de *Proceratophrys* ainda é bastante conflitante e a classificação mais completa do gênero foi realizada com base em aspectos de caracteres morfológicos externos de indivíduos adultos, com espécies agrupadas em quatro grupos fenéticos ou complexos de espécies: *P. boiei*, *P. appendiculata*, *P. bigibbosa* e *P. cristiceps* (IZECKSOHN *et al.*, 1999; GIARETTA *et al.*, 2000 ; KWET; FAIVOVICH, 2001; PRADO; POMBAL, 2008), mesmo com evidências moleculares apontando para a natureza não monofilética dos grupos (PRADO; POMBAL, 2008; AMARO *et al.*, 2009; PYRON; WIENS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; PYRON, 2014), exceto para o grupo *P. bigibbosa*, único grupo recuperado como monofilético (AMARO *et al.*, 2009; PYRON; WIENS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013).

Existem ainda espécies que não estão associadas a nenhum desses grupos (FROST, 2020), como por exemplo, *P. rondonae* Prado e Pombal, 2008, *P. minuta* Napoli, Cruz, Abreu e Del Grande, 2011, *P. redacta* Teixeira, Amaro, Recoder, Vechio e Rodrigues, 2012, e *P. schirchi* Miranda-Ribeiro, 1937, por apresentarem características peculiares que não se enquadram em nenhum dos grupos anteriores (PRADO e POMBAL, 2008; NAPOLI *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012; MÂNGIA *et al.*, 2014).

Há poucos dados na literatura sobre os cromossomos e a citogenética deste grupo de sapos. Para *P. boiei*, foram realizados estudos citogenéticos com coloração convencional com Giemsa, bandamento C e impregnação com nitrato de prata da região organizadora de nucléolo (Ag-RON), que revelaram número diploide de $2n = 22$ cromossomos e região organizadora de nucléolo (RON) localizada no par 8, além de um heteromorfismo entre cromossomos homólogos, indicando a presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW diferenciados. Também há relatos de diferenças na quantidade de heterocromatina constitutiva e nas posições da NOR entre populações do sul e sudeste do Brasil (ANANIAS *et al.*, 2007; AMARO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2021).

Recentemente, Da Silva e colaboradores (2021) acrescentaram dados na literatura de *Proceratophrys* com a descrição cariotípica de mais três espécies até então com cariótipos desconhecidos: *P. melanopogon*, *P. schirchi* e *P. laticeps* (Figura 1). Nesse trabalho essas espécies também apresentaram número diploide de $2n = 22$ cromossomos (Figura 1). Nas espécies *P. schirchi* e *P. laticeps* a RON é encontrada no braço longo do par 8, adjacente ao centrômero e co-localizada a uma constrição secundária, sendo este o mesmo par detectado para a espécie *P. boiei* (Figura. 1 – a, b e d). Já para *P. melanopogon* a RON está localizada no braço curto do par 4, coincidindo com uma região de constrição secundária (Figura 1 – c).

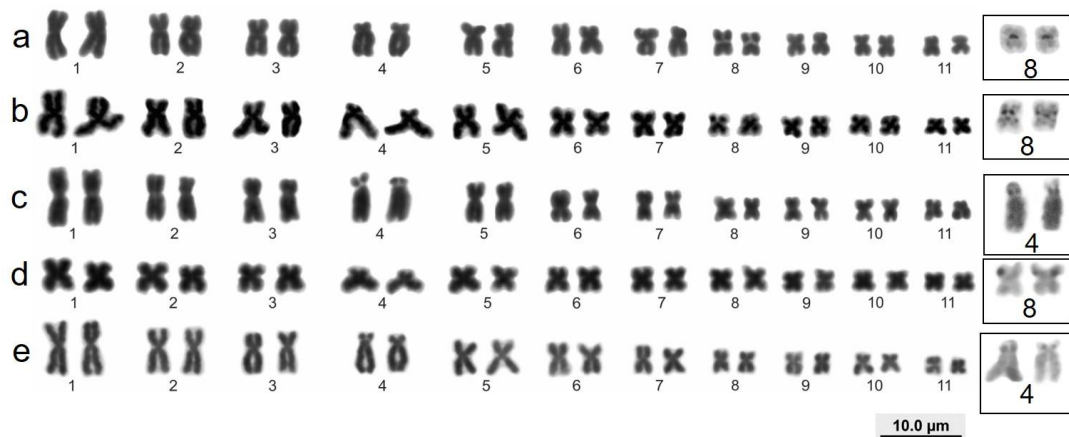


Figura 1. Cariótipos com coloração convencional em Giemsa. **a)** *P. schirchi* (Santa Teresa - SP); **b)** *P. laticeps* (Santa Teresa - SP); **c)** *P. melanopogon* (Mogi das Cruzes – SP); **d)** *P. boiei* (Camanducaia – MG, Mogi das Cruzes – SP); **e)** *P. boiei* (Tijucas do Sul, São José dos Pinhais, Morretes – PR). Quadros em destaque mostram a localização da NOR após impregnação por Nitrato de Prata. Fonte: DA SILVA *et al.*, 2021).

Um estudo filogenético foi realizado por Pyron e Wiens (2011) em Amphibia com uso de dados moleculares de 12 genes (3 mitocondriais e 9 nucleares), para a construção de filogenias para um grande número de espécies de anfíbios (Figura 2). Para o gênero *Proceratophrys*, a filogenia proposta não abrange todas as espécies conhecidas até o momento, mas, por envolver um grande número de marcadores e incluir as espécies de interesse para o presente trabalho, foi a filogenia de referência selecionada para discutir os resultados aqui obtidos. As espécies *P. schirchi*, *P. melanopogon* e *P. laticeps* ocupam posições filogenéticas próximas, e apesar de não-irmãs, essas espécies compartilham cariótipo relativamente semelhante, porém com algumas características cromossômicas divergentes, como por exemplo, RONs e bandas C (DA SILVA *et al.*, 2021).

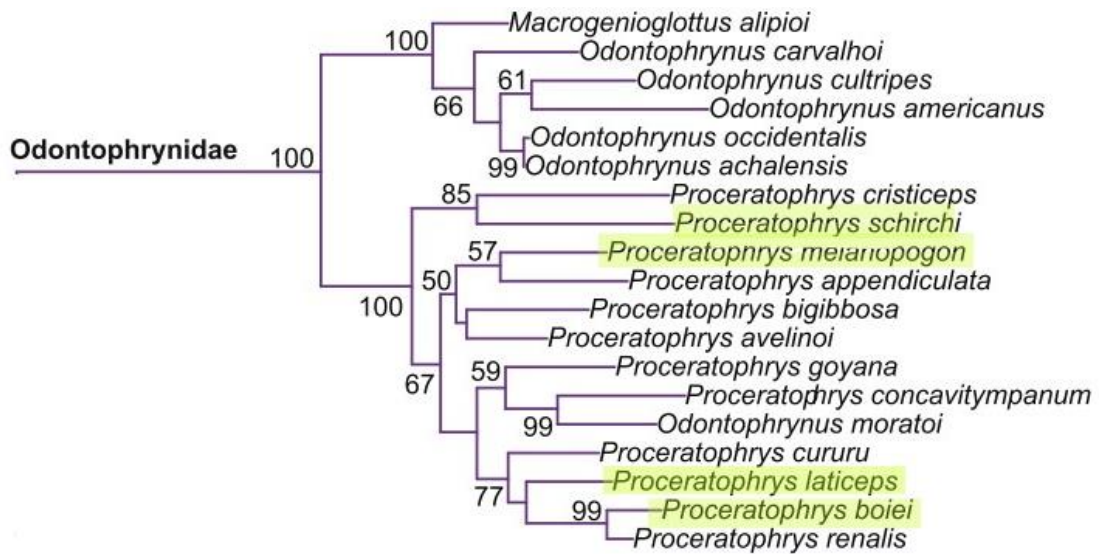


Figura 2. Filogenia para Odontophrynidae retirada de Pyron; Wiens (2011), editada para dar destaque as espécies de interesse no presente trabalho.

Os recentes dados citogenéticos publicados para as três espécies do gênero *Proceratophrys* (*P. schirchi*, *P. melanopogon* e *P. laticeps*) juntamente com os resultados panorâmicos sobre a citogenômica de *P. boiei* abriram caminho para estudos cromossômicos moleculares. Os DNAsats caracterizados de *P. boiei* por Da Silva e colaboradores (2020) permitiram estudos relacionados ao compartilhamento e análise dessas sequências repetitivas em espécies relacionadas. Dessa forma, seguindo com o intuito de contribuir para um melhor entendimento acerca dos mecanismos evolutivos propostos para sequências repetitivas o presente estudo envolveu a caracterização, localização cromossômica e análises em nível de sequências de DNAsats em espécies do gênero *Proceratophrys*.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o compartilhamento e a localização de sequências de DNAs satélites nos genomas de *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon*, utilizando como base DNAsats previamente descritos para *P. boiei*, na tentativa de melhor entender o comportamento evolutivo quanto a abundância e a divergência desse tipo de sequências nas espécies estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foi utilizado material citogenético (suspensões celulares de medula) de um espécime macho e um espécime fêmea de *P. schirchi* (Figura 3A) coletados em Santa Teresa - ES, um espécime macho de *P. laticeps* (Figura 3B) coletado em Santa Teresa – ES, um espécime fêmea e um espécime macho de *P. melanopogon* (Figura 3C) coletado em Mogi das Cruzes – SP (Figura 4). Os animais aqui citados foram coletados por meio de busca ativa na natureza sob autorização do ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, números 59449 e 60972 e certificado pelo SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (código de cadastro: A6E6A36), para projetos anteriores da equipe de estudo do Laboratório de Citogenética Animal, da Unesp-Rio Claro. A eutanásia dos espécimes foi realizada sob aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA – IB – UNESP – CRC), sob o protocolo 004752. As preparações citogenéticas e amostras de tecido para extração de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Citogenética Animal, do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP, campus de Rio Claro para utilização em experimentos de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

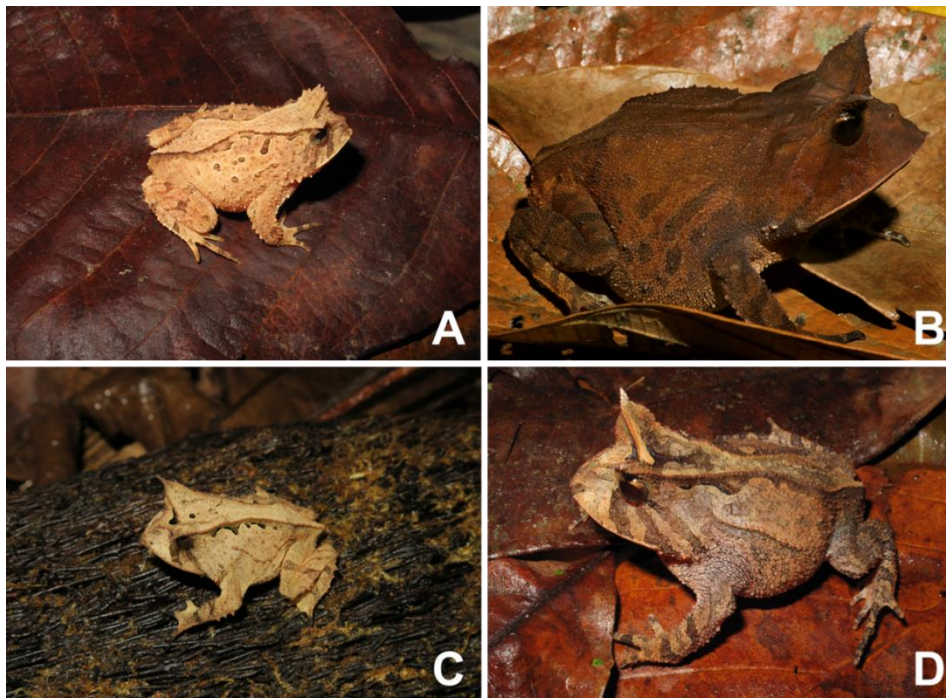


Figura 3. Imagens dos animais analisados no presente trabalho. Em **A:** *Proceratophrys schirchi*; **B:** *Proceratophrys laticeps* **C:** *Proceratophrys melanopogon*; **D:** *Proceratophrys boiei* (Fotos: Célio F. B. Haddad).



Figura 4. As estrelas indicam os locais aproximados das coletas dos indivíduos analisados no presente trabalho. Fonte: Google Maps, adaptado.

3.2 Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado dos espécimes utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega®, seguindo as determinações do fabricante. As amostras extraídas foram aplicadas em gel de agarose 1% corados com 1µL de GelRed (Invitrogen®). A avaliação da qualidade das amostras foi realizada através da visualização das bandas em um transiluminador de luz ultravioleta e a quantificação foi feita por espectrofotômetro NanoDrop® 2000, Thermo Scientific® de alta precisão, utilizando 1µL de cada amostra extraída.

3.3 Sequenciamento genômico

Foi utilizado sequenciamento genômico de baixa cobertura Illumina® HiSeq™ 4000 (2 x 150 bp *paired-end*), realizado pela empresa Novogene (HK) Co., Ltd., (Hong Kong, China), utilizando *TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3*. O sequenciamento foi realizado a partir de uma amostra de DNA total liofilizado de cada um dos 5 exemplares de *Proceratophrys* estudados: uma fêmea e um macho de *P. schirchi*, uma fêmea e um macho de *P. melanopogon* e um macho de *P. laticeps*.

3.3.1. Caracterização do satelitoma

Os genomas sequenciados foram analisados com o uso do *software on line RepeatExplorer2* (NOVÁK *et al.*, 2020) para a caracterização dos satélites presentes no genoma de *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon*. O *output* do programa gera uma lista de DNAs satélites putativos presentes para os genomas analisados, organizados em ordem crescente à proporção de abundância calculada para cada satélite dentro do total de *reads* analisados pelo programa, bem como uma sequência consenso para cada DNA satélite recuperado, uma vez que esta versão do programa possui a ferramenta “*Tandem Repeat Analyzer*” (TAREAN) integrada em sua execução. Assim, retornou uma lista do satelitoma para cada uma das espécies analisadas que foram então organizadas e todas as famílias de satDNAs foram numeradas em ordem decrescente de abundância genômica, seguindo o critério de identidade proposto por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016).

3.3.2. Busca pelas sequências caracterizadas para *P. boiei*

Junto desta primeira triagem foi realizada a busca pelos três satDNAs caracterizados previamente para *P. boiei* (PboSat1-176/ NCBI: MN475836.1; PboSat2-173/ NCBI: MN475837.1; PboSat3-189/ NCBI: MN475838.1) por Da Silva e colaboradores (2020). Para isso, foi utilizada a ferramenta “*Custom repeat database*” presente no próprio programa *RepeatExplorer2*, que permite a adição de uma biblioteca de sequências personalizada, o que gera no *output* do programa uma coluna com a informação para *clusters* que obtiveram *hits* de similaridade com as sequências de interesse. Com isso, foi possível localizar o *cluster* correspondente de cada uma das espécies analisadas neste trabalho para as sequências já descritas de *P. boiei*, o que permitiu a comparação de similaridade entre elas.

As sequências consensos geradas para *P. schirchi*, *P. laticeps* e *P. melanopogon* que resultaram compartilhamento positivo entre os satDNAs de *P. boiei*, foram analisadas e alinhadas, para a busca por similaridade utilizando a ferramenta *Muscle* (EDGAR, 2004) no programa *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009). A ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Acesso: abril de 2022) foi utilizada para verificar se as sequências de satDNAs recuperadas para as espécies de *Proceratophrys* possuíam similaridade com outras sequências existentes na plataforma. As sequências consensos dos DNAs satélites obtidas para as espécies de *Proceratophrys*, foram depositadas no banco de dados Genbank sob os *vouchers*: PscSat1-177: OP039019; PscSat25-190: OP039020;

PmeSat1-177: OP039021; PmeSat7-189: OP039022; PlaSat5-190: OP039023; PlaSat8-177: OP039024.

3.3.3 Cálculo da abundância e divergência estimada para os satDNAs caracterizados de *P. boiei* entre as espécies de *Proceratophrys*

Para estimar a abundância e divergência (Kimura-2-parameter – K2P, com CpG ajustada) para cada uma das sequências de interesse em cada um dos genomas analisados foi utilizado o *RepeatMasker* (SMIT *et al.*, 2013-2015) pelo servidor Kasahara-ICG/*Insect Cytogenomics Group*, localizado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada, UNESP – Rio Claro. Com o uso dos arquivos gerados pelo *RepeatMasker* foi estimada a divergência K2P para cada fragmento de cada um dos satDNAs contra a biblioteca de referência (PboSat1-176; PboSat2-173; PboSat3-189) usando o *script calcDivergenceFromAlign.pl*. Foi então construído um gráfico para cada satDNA estudado, retratando a abundância relativa da sequência no eixo y e a divergência K2P no eixo x, para visualizar a abundância para as variantes do satDNA nos diferentes graus de divergência. A abundância final de cada um dos satDNA foi calculada pela proporção de nucleotídeos alinhados com cada sequência referência (PboSat1-176; PboSat2-173; PboSat3-189) dividido pela biblioteca total (pares de bases).

3.4 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

A obtenção de sondas foi realizada via PCR com o uso do *primer* construído para os satélites PboSat2-173 e PboSat3-189 caracterizado em *P. boiei* (DA SILVA *et al.*, 2020), no DNA extraído de indivíduos de *P. schirchi* (macho e fêmea), de *P. laticeps* (macho) e de *P. melanopogon* (macho). Os produtos obtidos por PCR foram marcados com digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) por “*Nick Translation*”. Foram utilizadas preparações cromossômicas de cada uma das espécies e a hibridação seguiu conforme o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) e Cabral-De-Mello e Marec (2021). As sondas foram detectadas com o uso de anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) e as lâminas montadas em meio contendo 4',6-diamidino-2'-phenylindole (DAPI) + VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA).

O material foi observado em um microscópio Olympus BX61 equipado com lâmpadas fluorescentes e filtros apropriados, as imagens fotografadas pela câmera digital integrada DP70, e sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste com o uso do Adobe *Photoshop* CS6. Metáfases foram analisadas para a verificação da localização cromossômica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos no manuscrito: Repetitive sequences shared in *Proceratophrys* species according to the library hypothesis of satellite DNA Evolution, a ser submetido à publicação em revista científica da área, após a defesa.

4.1. Manuscrito

Repetitive sequences shared in *Proceratophrys* species according to the library hypothesis of satellite DNA evolution.

R. F. Destro¹, M. J. Silva¹, C. Crepaldi¹, C. F. B. Haddad¹ and P. P. Parise-Maltempi¹

¹Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil

ABSTRACT

Recent studies have shown that satellite DNA plays important biological roles, such as participation in the organization of centromeres and in modulation of gene expression in different organisms. The advancement in sequencing technologies combined with bioinformatics tools has provided a wealth of information about repetitive sequence organization, location, number of copies, size of repetitions, variability of repetition, functional role and evolution. Studies that combine these analysis, alongside molecular genetic techniques, have contributed to the knowledge of evolutionary mechanisms that may be occurring within phylogenetically related groups. Therefore, the present study aimed to investigate if satellites DNAs previously found in the genome of *Proceratophrys boiei* are shared among phylogenetically related species of this genus, and if so, whether they follow evolutionary patterns proposed for this type of sequences, this, through genomic sequencing and bioinformatics analysis, with characterization, mapping and sequence analysis, these species being: *Proceratophrys schirchi*, *Proceratophrys melanopogon* e *Proceratophrys laticeps*. Thus, this study uncovered the presence of satellite DNA – PboSat2-173 - in all three species studied, however, with variation in abundance and sequence divergence, but sharing chromosomal location in the centromeric region of all chromosomes for all three species of *P. melanopogon*, *P. laticeps* and *P. schirchi*. The satellite PboSat3-189 it is also shared between all three species with variation in abundance and sequence divergence, however, with specie-specific chromosome location. Our results for both studied satellites therefore corroborate in what is proposed by the library hypothesis for the evolution of satellite DNA sequences.

Key-words: Cytogenetics, RepeatExplorer, *In situ* Hybridization, Evolution.

Introduction

Satellite DNAs (satDNAs) are important chromosomal components, involved in biological roles, such as centromeres and telomere organization, gene expression modulation, sex chromosomes differentiation, increase of genome size, among others (PLOHL *et al.*, 2012, 2014; GARRIDO-RAMOS, 2015; UGARKOVIĆ, 2021). Several evolutionary mechanisms are involved in the complexity, homogeneity, monomeric size and rapid evolution of these sequences (THAKUR *et al.*, 2021). The library hypothesis of satDNAs predicts that related species share an ancestral set of conserved satDNA families, which is also present in, a some level, common ancestor (FRY and SALSER 1977; MESTROVIC *et al.*, 1998). However, these sequences can be amplified at unequal rates in each species (GARRIDO-RAMOS, 2017; THAKUR *et al.*, 2021). The monomeric variants of a satDNA family then show interspecific conservation (MESTROVIC *et al.*, 1998, PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

Once a satDNA family is dispersed in a genome each segment constituting different satDNA *loci* could undergo independent evolution and diverge from one another within the genome of a species (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Despite of what is expected members of a satDNA family usually display relatively low divergence as they undergo a mechanism called concerted evolution, in which mutations are not accumulated in a single monomer but are either propagated in the monomeric units of a satDNA or are eliminated (DOVER, 1982; PLOHL *et al.*, 2012).

Efficiently pipelines for studies of satDNAs with High Throughput Sequencing (NGS) are developed, such as *RepeatExplorer* (RE) (NOVÁK *et al.*, 2010, 2013) and *Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN) (NOVÁK *et al.*, 2017) that enable the *de novo* identification of repetitive DNA sequences in species without a reference genome (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016, 2018; MILANI *et al.*, 2018; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2018, 2020; UTSUNOMIA *et al.*, 2019; BARDELLA *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021). These computational tools in combination with polymerase chain reaction (PCR), southern blotting and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) provide a wealth of information about the organization, location, number of copies, size of repeats, variability, functional role, and evolution of these repetitive sequences in phylogenetic related species (PEZER *et al.*, 2011; QUESADA DEL BOSQUE *et al.*, 2013; PLOHL *et al.*, 2014; GARRIDO-RAMOS, 2017).

For amphibians, the knowledge about repetitive sequences is still scarce, with data generated by treatment with restriction enzymes and isolation of sequences by PCR (VITTORAZZI *et al.*, 2011, 2014, 2021; GATTO *et al.*, 2016, 2018, 2021; BUENO *et al.*, 2021; GUZMÁN *et al.*, 2022). Only recently, through analysis of genomic sequencing and bioinformatics data, Da Silva *et al.* (2020), revealed for the first time a large amount of satDNAs in the genome of the frog *Proceratophrys boiei*, the three most abundant of them being: PboSat1-176, PboSat2-173 and PboSat3-189.

The cytogenetic data of *Proceratophrys* is restricted of a few species of the genus, one being *Proceratophrys boiei* (ANANIAS *et al.*, 2007; AMARO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2021). More recently, Da Silva *et al.* (2021) added cytogenetic data in the literature of *Proceratophrys* with the karyotypic description of three more species with unknown karyotypes: *P. melanopogon*, *P. schirchi* e *P. laticeps*, which, according to the phylogeny elaborated by Pyron and Wiens (2011), occupy close phylogenetic positions and, despite being non-sisters, these species share a relatively similar karyotype, but with some divergent chromosomal characteristics, such as NORs and C-banding (DA SILVA *et al.*, 2021).

Thus, cytogenetic data for three new species of the genus *Proceratophrys*, (*P. schirchi*, *P. melanopogon* e *P. laticeps*) together with the panoramic results on the cytogenomics of *P. boiei* opened the possibility for molecular chromosomal studies. The characterized satDNAs of *P. boiei* by Da Silva *et al.* (2020) allowed studies regarding the sharing and the analysis of these repetitive sequences in related species. Therefore, in order to contribute to a better understanding of the evolutionary mechanisms proposed for repetitive sequences, the present study involved characterization, chromosomal location and sequence-level analyzes of satDNAs in species of *Proceratophrys* genus.

Material and methods

Material

The individuals used in this work had already been collected for previous studies, being one specimen male and one female of *P. melanopogon* in Mogi das Cruzes – SP, one specimen male and one female of *P. schirchi* in Santa Teresa - ES and one male of *P. laticeps* in Santa Teresa - ES, under collection licenses issued by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) protocol N°. 59449 and 60972. The euthanasia of the specimens was performed under the consent and approval of the Ethics Committee on Animal Use - CEUA Biosciences Institute, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil (permission 004752/2017), certificate by

National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge - SisGen, ID: A6E6A36). The animals were deposited in the Célio F. B. Haddad (CFBH) amphibian collection, housed in the Department of Biodiversity, Biosciences Institute, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. Metaphase chromosomes and tissue samples for DNA extraction were stored in a freezer at -20°C in the Laboratory of Animal Cytogenetics, Department of Biology, UNESP, Rio Claro, for use in Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH).

Genome Sequencing

Genomic DNA extraction was obtained from liver samples of one female and one male of *P. schirchi*, one female and one male of *P. melanopogon* and one male of *P. laticeps* using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega®, according to the manufacturer's recommendations. The total DNA samples obtained were freeze dried and used to genome sequencing by Illumina® HiSeq™ 4000 (2 x 150 bp *paired-end*), by the company Novogene (HK) Co., Ltd., (Hong Kong, China).

SatDNA analysis

Genomic DNA sequencing libraries were used to perform a graph-based clustering assembly using the RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al.*, 2020), setting default options using as input 500.000 reads of female and 500.000 reads of male totaling 1×10^6 reads for *P. melanopogon*, *P. schirchi* and 500.000 reads of male of *P. laticeps*. The feature “*Custom repeat database*” was used to search for *P. boiei* satDNAs (PboSat1-176/ NCBI: MN475836.1; PboSat2-173/ NCBI: MN475837.1; PboSat3-189/ NCBI: MN475838.1). This version of RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al.*, 2020) also runs the tool “*Tandem Repeat Analyzer*” (TAREAN) which provides a list of putative satDNAs and their respective consensus sequences. Thus, the consensus of the clusters with similarity hits with *P. boiei* satDNAs were extracted for homology analysis with *Muscle* (EDGAR, 2004) on *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009). BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Access: April, 2022) was used to search if the satDNAs sequences, for the three *Proceratophrys* species, have significant similarity to sequences of the database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). The consensus sequences of each sequence recovered in this study were submitted to be deposited in Genbank (Vouchers: PscSat1-177: OP039019; PscSat25-190: OP039020; PmeSat1-177: OP039021; PmeSat7-189: OP039022; PlaSat5-190: OP039023; PlaSat8-177: OP039024).

Estimation of SatDNA abundance and divergence with RepeatMasker

RepeatMasker (SMIT *et al.*, 2013-2015) with rmbblast engine was used to determine abundance and average nucleotide divergence (Kimura-2- parameter, K2P) with adjusted CpG, for the satDNAs in the different species of *Procetophrys*. Genomic abundance for the satDNAs in each species was estimated as the number of nucleotides aligned to the reference consensus divided by the library size (in bp). Repeat landscape charts were generated for each sequence for the relative abundance (Y-axis) at 1% intervals of K2P distance from the consensus (X-axis), using the script calcDivergencFromAlign.pl (from RepeatMasker utils).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

The probes used were obtained by PCR using the primers built for *P. boiei*: PboSat2-173 and PboSat3-189 (Table 1; DA SILVA *et al.*, 2020) in the total genomic DNA, from a male and a female of *P. schirchi*, in a male of *P. laticeps* and in a male of *P. melanopogon*. The labeling was performed by nick-translation with digoxigenin-11-dUTP (Roche®) and detected by antidigoxigenin-rhodamine (Roche), following the method described by Pinkel *et al.* (1986), and Cabral-de-Mello and Marec (2021). The chromosomes were counterstained using 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and slides were mounted in VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA).

The slides were visualized and metaphases were analyzed to confirm the FISH results under an Olympus® BX61 fluorescence microscope, with a digital camera Olympus® DP70 attached, images were captured, merged and optimized for brightness and contrast with Adobe Photoshop CS6.

Results

Computational analysis

Computational analysis using *RepeatExplorer2* (NOVÁK *et al.*, 2013) carried out in February 2022, generated putatives satDNAs for each of the *Procetophrys* species, that were organized and the families of satDNAs were numbered in descending order of genomic abundance, following the identity criteria proposed by Ruiz-Ruano *et al.* (2016).

The output generated by *RepeatExplorer2* (NOVÁK *et al.*, 2020), returned, for the satDNAs PboSat1-176 and PboSat2-173 similarity for the same cluster, in each analysis for the

three different species of *Proceratophrys* (*P. schirchi*, *P. melanopogon* and *P. laticeps*) and in later analyzes it was identified that the satellite PboSat1-176 and PboSat2-173 are variants of the same satellite (DA SILVA *et al.*, unpublished data). So, for the present study, the sequence and primer designed from the PboSat2-173 satellite were used to perform the analysis of location of this satDNA in *P. schirchi*, *P. melanopogon* and *P. laticeps*. And a primer was designed for the PscSat1-177 sequence.

RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al.*, 2020), revealed the PboSat2-173 satDNA is the present in the three *Proceratophrys* species: *P. schirchi*, *P. laticeps* and *P. melanopogon*. Similarity analysis of the consensus sequences generated for each species were compared together and separately against the consensus rescued from *P. boiei* by *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009). The comparison between the four sequences base pair identity was obtained in 75,8%, and separately from 69.7% (*P. schirchi*), 84.8% (*P. melanopogon*) and 80.3% (*P. laticeps*). GenBank database search for the consensus sequences obtained for the three species of *Proceratophrys* did not result in similarity with other deposited sequences (Figure 1).

RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al.*, 2020), returned that the PboSat3-189 satDNA is also present in all three species and analyses by *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009) revealed that comparison between the four consensus sequences, base pair identity was obtained in 89.3%, and separately from 88.9% (*P. schirchi*), 89.8% (*P. melanopogon*) and 91.1% (*P. laticeps*) (Figure 2). Search in the GenBank database for the consensus sequences obtained for the three species of *Proceratophrys* resulted in similarity with sequences from clones of the PcP190 satellite DNA sequences in different species (Figure 3), already studied by Vittorazzi *et al.* (2011, 2014), Gatto *et al.* (2016, 2018) and Bueno *et al.* (2021), and for that the most significant sequences were then rescued and aligned with the *Proceratophrys* sequences. General information of satDNAs study in the present work is available in Table 2.

Abundance and Divergence between genomes for PboSat2-173 and PboSat3-189.

Repeat Masker analysis calculated the levels of abundance and divergence of PboSat2-173 and PboSat3-189 in each *Proceratophrys* genome (Table 3), and landscape chart was built for PboSat2-173 (Figure 4) and PboSat3-189 (Figure 5), using RepeatMasker output for the four *Proceratophrys* species, and its shows the relative abundance of the sequence on the y-axis and the percentage K2P divergence on the x-axis, thus illustrates the abundance for the satDNA variants at different degrees of divergence.

SatDNAs mapping

The chromosome mapping of the PboSat2-173 for *P. schirchi* (Figure 6 C), *P. melanopogon* (Figure 6 I) and *P. laticeps* (Figure 6 L), showed that this satDNA is located in the centromeric region of all chromosome pairs of these species.

Mapping of PboSat3-189 satellite in male and female of *P. schirch* is possible to see bands co-located with secondary constriction along the long arms of chromosome pair 8, being coincident with NOR (Figure 7 C and F). For *P. melanopogon*, the satellite was located in two bands in the pericentromeric region, on the long arm of pair 1 (Figure 7 I). For *P. laticeps*, the satellite was located in the centromeric region of the 1 and 8 chromosome pairs (Figure 7L).

Discussion

Studies on evolutionary mechanisms involved in the dynamics of satellite DNAs are crucial for a complete understanding of this still enigmatic fraction of genomes (GARRIDO-RAMOS, 2015; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012; PLOHL *et al.*, 2012; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016, 2018). In amphibians, these analyzes are restricted to a few genus, and thus, the data from this study provide information for the construction of knowledge about satDNAs sequences in these animals (DA SILVA *et al.*, 2020; VITTORAZZI *et al.*, 2014, 2021; GATTO *et al.*, 2016, 2018, 2019; BUENO *et al.*, 2021; GUZMÁN *et al.*, 2022).

Both satellites previously studied for *P. boiei* were recovered by bioinformatics analysis in the three species of *Proceratophrys* here analyzed, however, with different chromosomal location patterns. PboSat2-173 was localized in the centromeric regions of all chromosomes in *P. laticeps* and *P. melanopogon*, as found by Da Silva *et al.* (2020) in *P. boiei*, but no signal was found in the *P. schirchi* chromosomes. On the other hand, PboSat3-189 the *Proceratophrys* studied here had punctual specie-specific locations, different from the centromeric and pericentromeric signals found in all chromosome pairs of *P. boiei* (DA SILVA *et al.*, 2020).

Analyzes of PboSat2-173 satellite revealed from the recovered consensus sequences, that for *P. laticeps*, *P. melanopogon* and *P. boiei* these sequences are part of a family of satDNAs, since they share more than 80% similarity in base pairs for *P. schirchi*, the recovered sequence is part of the superfamily category for obtaining approximately 70% similarity with the other sequences, following the classification suggested by Ruiz-Ruano *et al.* (2016). For the PboSat3-189 satellite, similarity analyzes of consensus sequences revealed that they are part of

a satDNA family, since they share more than 80% similarity in base pairs (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016).

SatDNAs analyzes reveal that the four species of the genus share the satDNAs PboSat2-173 and PboSat3-189, but with specific abundance and divergence for each species. This agrees with the satDNA library hypothesis, which predicts that, phylogenetically related species share a collection of ancestral satellite DNAs, that undergo different evolutionary force after speciation, generating species-specific profiles for this type of sequence (FRY and SALSER, 1977; PALACIOS-GIMENEZ, *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

The landscape chart for the analysis of abundance and divergence for both satellites show interesting results given the peaks and values for K2P% for the studied satellite sequences recovered in the species studied. According to Ruiz-Ruano *et al.* (2019), landscape graphs for this type of sequence can be very informative about the “age” of the variants of a satDNA of the same family. Thus, it can be inferred that peaks at low divergence reveal recent amplification and homogenization, as seen for *P. boiei* for both satDNAs, while those at high levels of divergence probably constitute older variants degenerated by the accumulation of mutations.

Landscape-graph referring to PboSat2-173 reveals peaks of amplifications of older variants of this satellite in *P. laticeps*, in relation to the peak observed for *P. boiei*. As for *P. melanopogon* and *P. schirchi*, the data show that for both male and the female individual of these species, there are no significant peaks, but “horizontal” distributions, which suggests the presence of variants with low abundance when compared to the two other species (RUIZ-RUANO *et al.*, 2019). PboSat3-189 landscape reveals for *P. laticeps* peaks of amplification of older variants for the satellite, and for *P. melanopogon* the graph reveals a peak of amplification and homogenization of satDNA variation for both sexes of the species even older in relation to *P. boiei* and *P. laticeps*. Data also showed that, for both the male and the female of *P. schirchi*, as found for PboSat2-173 that there are no significant peaks for the satellite PboSat3-189.

According to Pyron and Wiens (2011), phylogenetic relationship for *Proceratophrys*, shows *P. schirchi* in a divergent lineage from the other species studied here and with a low relative abundance for PboSat3-189 when compared to *P. melanopogon*, *P. laticeps* and *P. boiei*. Thus, it can be suggested that this higher satellite abundance in these species may have arisen from an amplification event that occurred in a common ancestor, leading to later amplification and homogenization events, which result in higher abundances found in the analyzes here presented, but to better understand this issue, it would be necessary to study this

sequence in a greater number of species of the genus (FRY and SALSER, 1977; RUIZ-RUANO *et al.*, 2019; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2020).

The PboSat2-173 chromosomal location in the centromeric region for all chromosomes in the species *P. melanopogon* and *P. laticeps* for PboSat2-173, corroborates the findings for *P. boiei* by Da Silva *et al.* (2020). *P. schirchi* FISH signals for this satDNA were only found using a primer designed with the PscSat1-177 sequence and it was also found in the centromeric region of all chromosomes, thus being likely to be a centromeric satDNA in *Proceratophrys* genus. There may be some non-excludent reasons why no signals were revealed on the chromosomes metaphases using the primer designed for PboSat2-173 sequence: (i) the sequences of *P. boiei* and *P. schirchi* share superfamily satDNA level; (ii) the high K2P values for this satellite; (iii) and this specie being in a divergent lineage from the others species.

Chromosomal mapping brought an interesting result related to the location of PboSat3-189 satDNA family, which is located in the centromeric and pericentromeric regions of all *P. boiei* chromosomes (DA SILVA *et al.*, 2020). In contrast to the results observed for *P. schirchi* and *P. melanopogon*, which show punctual signals restricted to a chromosome pair that are located on the long arm of these and in *P. laticeps* it is found on only two pairs of chromosomes, but in the centromeric region. Variation regarding the location shows the dynamics of this type of sequence in the genomes, as also found in the works for the sequences of the PcP190 satellite (VITTORAZZI *et al.*, 2014; GATTO *et al.*, 2016, 2018, 2019).

Search for the sequences PlaSat5-190, PmeSat7-189, PscSat25-190 in GenBank resulted in similarity with sequences from clones from the PcP190 satellite as Da Silva *et al.* (2020) had already described. Members of this satellite DNA superfamily have already been confirmed in amphibian species of the genus *Physalaemus*, *Cycloramphus*, *Leptodactylus*, *Crossodactylus*, *Lysapsus* and *Pseudis*, thus a sequence conserved for more than 70 million years (VITTORAZZI *et al.*, 2014, 2021; GATTO *et al.*, 2016, 2018, 2019; BUENO *et al.*, 2021). This satellite DNA being shared also for the species of the genus *Proceratophrys* reinforces that it may be being shared by more anuran amphibians, as supposed by Gatto *et al.* (2016).

The alignment generated by Geneious v4.8 of the sequences obtained by BLAST reveals the presence of a hypervariable region and a more conserved region in *Proceratophrys*, as described by Gatto *et al.* (2016), which appears to be a conserved feature for this superfamily of satDNAs. Still in this work, Gatto *et al.* (2016) suggest by analyzing the similarity between the more conserved region (CR) and the transcribed region of the 5S rDNA for species of genus *Pseudis*, that non-homologous recombination between 5S rDNA and PcP190 satellite DNA

may play a role in the origin of new variants of the hypervariable region (HR), as they originate from different non-transcribed sequences (NTS) of the 5S rDNA, but they do not rule out the possibility that the CR is under greater selective pressure than the HR because it may have a certain function that is not yet well established (GATTO *et al.*, 2016).

However, in a later work, with the increase in the number of sequences for this satellite, Gatto *et al.*, (2019) analyzed both regions and observed that the similarity between the CRs is not greater than those of the hypervariable region (HR) providing preliminary evidence against the hypothesis of selective pressure at different rates for the two regions (CR and HR). The authors suggest that the analyses of this sequence in more species of anuran amphibians is fundamental for a better understanding of the evolution and possible role of it. Thus, the present work brings new possible variants of this satDNA superfamily and further analyses of the 5S rDNA in *Proceratophrys* can help, bringing more information about this issue.

The present study then, confirms the presence of the satellites PboSat2-173 and PboSat3-189 in the three studied species of the genus *Proceratophrys*, but with abundance, divergence and specific location for each species, corroborating the hypothesis of the library (FRY and SALSER, 1977). The results confirmed the similarity of PboSat3-189 with the PcP190 satellite, which also corroborates to this evolutionary model. However, studies in more species of the genus and in other groups of anuran amphibians are essential and necessary for a better understanding of the evolutionary mechanisms that involve this superfamily of satellite DNA and thus provide more data for a better understanding of the evolution of these types of sequences and the possible role that it may be playing in the genomes of these frogs.

Figures.

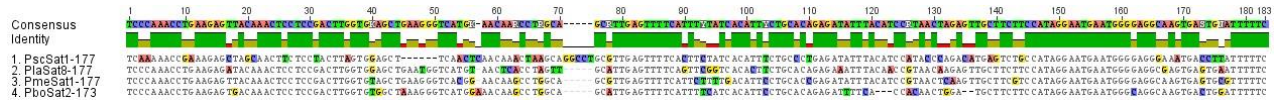


Figure 1. Alignment between the generated consensus sequences (PscSat1-177, PlaSat8-177, PmeSat1-177, PboSat2-173) by *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009).

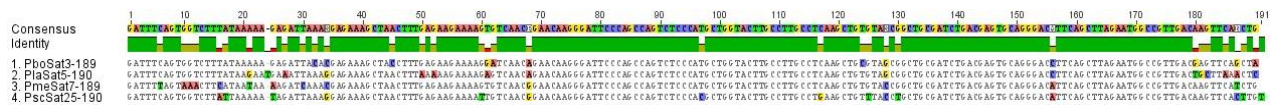


Figure 2. Alignment between the generated consensus sequences (PboSat3-189, PlaSat5-190, PmeSat7-189, PscSat25-190), by *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009).

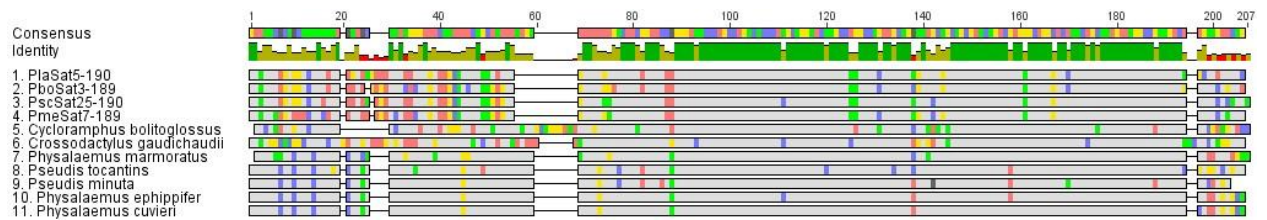


Figure 3. Alignment between sequences with similarity found by BLAST. **1:** PlaSat5-190; **2:** PboSat3-189 (Access number - AN- **3:** PscSat25-190; **4:** PmeSat7-189; **5:** *Cycloramphus bolitoglossus* clone C5_M2 satellite PcP190 sequence (AN: MT920601.1); **6:** *Crossodactylus gaudichaudii* clone 2 satellite PcP190 sequence (AN: KM361725.1); **7:** *Physalaemus marmoratus* clone 5.1 satellite PcP190 sequence (AN: KM361701.1); **8:** *Pseudis tocantins* clone C1-4 satellite PcP190 sequence (AN: KX170887.1) **9:** *Pseudis minuta* voucher ZUEC:11583 clone C7 satellite PcP190 sequence (AN: MH370440.1); **10:** *Physalaemus ephippifer* clone 2.1 satellite PcP190 sequence (AN: KM361699.1); **11:** *Physalaemus cuvieri* clone PcP190EcoRI_c12 satellite sequence (AN: JF281115.1) generated by *Geneious v4.8* (DRUMMOND *et al.*, 2009).

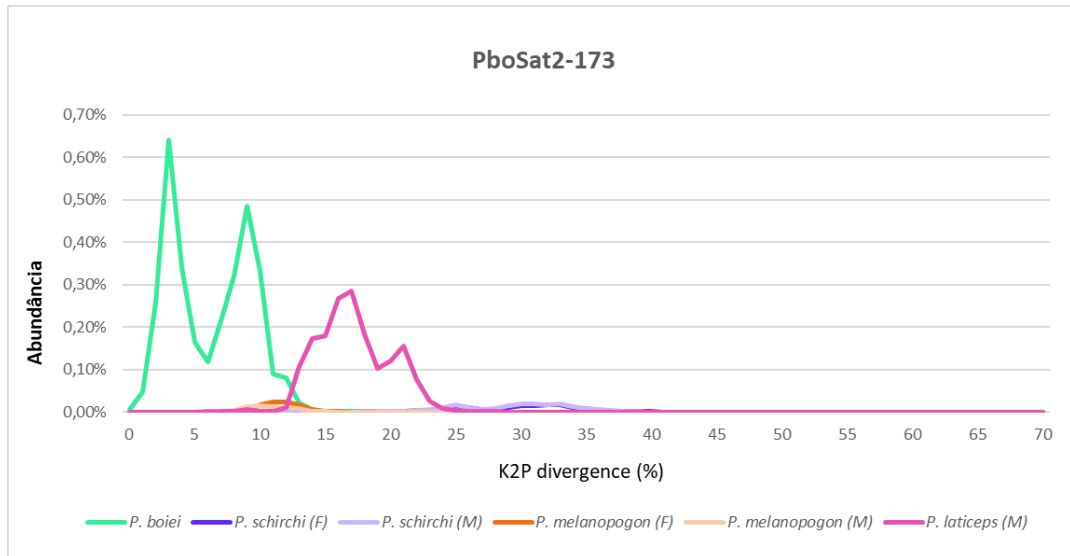


Figure 4. PboSat2-173 landscape in Y- Axis: Abundance; X- Axis: divergence K2P (%). Abundance level for each kimura index (K2P). F- Female; M: Male.

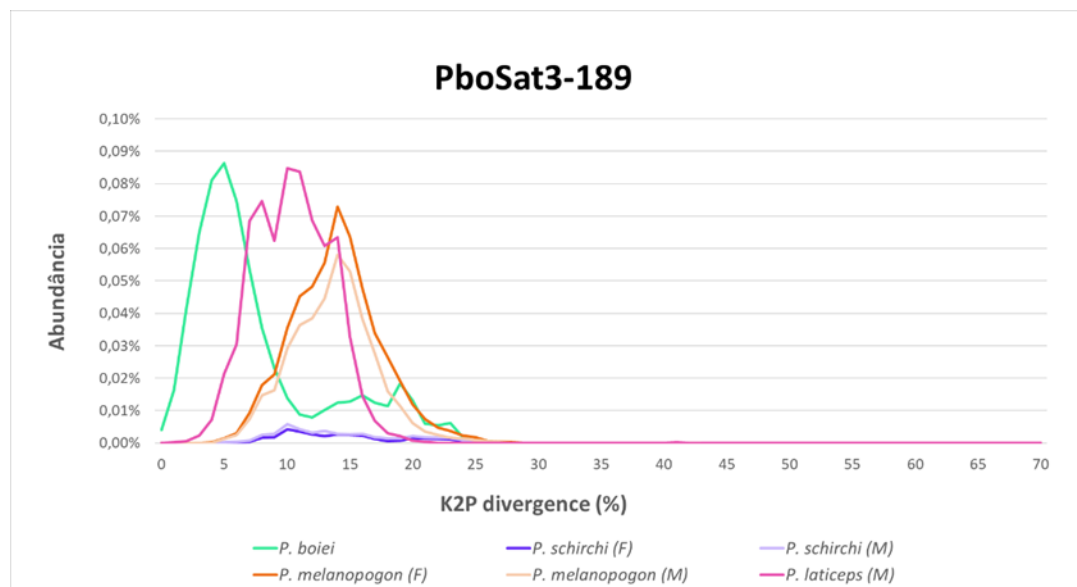


Figure 5. PboSat3-189 landscape in Y- Axis: Abundance; X- Axis: divergence K2P (%). Abundance level for each kimura index (K2P). F- Female; M: Male.

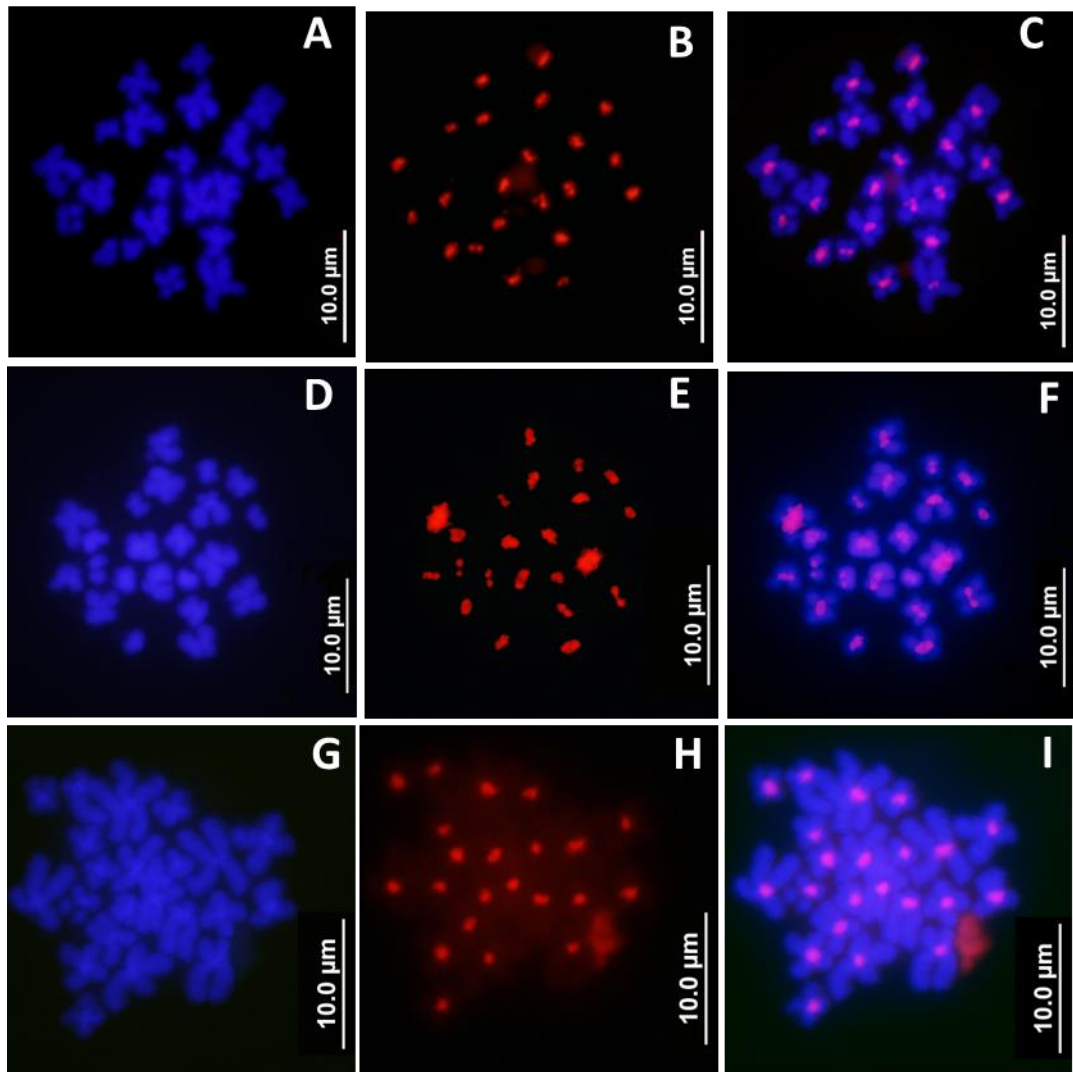


Figure 6. FISH mapping of PboSat2-173 in **A:** DAPI, **B:** DIG - anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) and **C:** Composition in *P. schirchi* (male); **D:** DAPI, **E:** DIG and **F:** *P. melanopogon* (male); **G:** DAPI, **H:** DIG and **I:** Composição in *P. laticeps* (male).

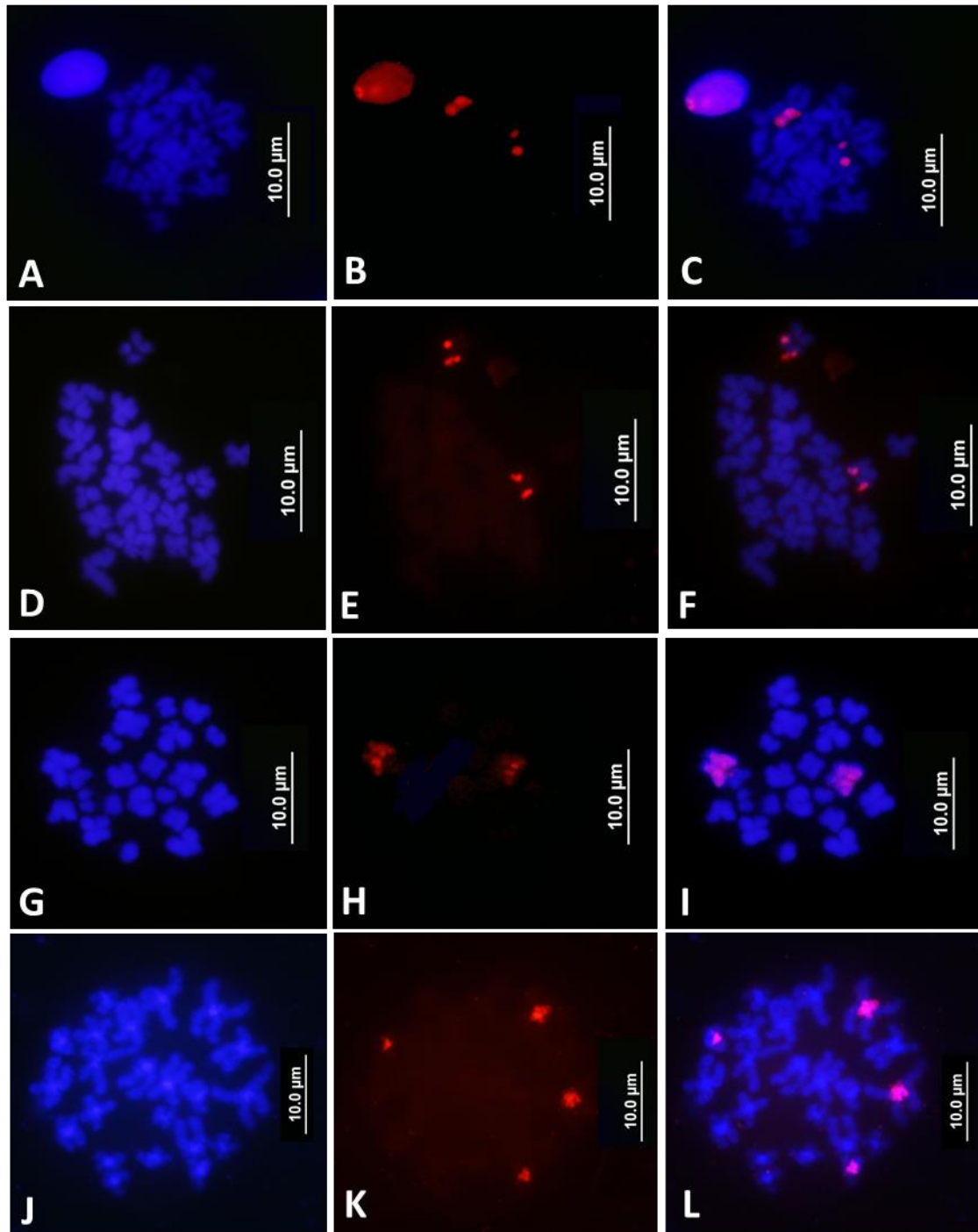


Figure 7. FISH mapping of PboSat3-189 in **A:** DAPI, **B:** DIG – anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) and **C:** Composition in *P. schirchi* (male); **D:** DAPI, **E:** DIG and **F:** Composition in *P. schirchi* (female); **G:** DAPI, **H:** DIG and **I:** Composition in *P. melanopogon* (male); **J:** DAPI, **K:** DIG and **L:** Composição in *P. laticeps* (male)

Tables.

Table 1. Primers used for amplification used for FISH mapping. Design by Da Silva *et al.*, (2020), and primer PscSat1-177F; PscSat1-177R design in this work.

Primer Name	Sequence
PboSat2-173F	CCTCCGACTTGGTGTGGC
PboSat2-173R	AGTTTGTCACTCTTCAGGTTTG
PboSat3-189F	CATGCTGGTACTTGCCTTGCC
PboSat3-189R	GAGACTGGCTGGGAATCCC
PscSat1-177F	AGCTCCACTAAGTAGGAGA
PscSat1-177R	TCAACTCCACAACTAAGCA

Table 2. satDNAs general information recovered by *RepeatExplorer2*.

Satellite Name	Cluster	Consensus Length [bp]	Proportion Ajusted [%]	Consensus	A+T [%]
PscSat1-177	5	177	0.6300	CCATTCATTCTATGGCAGACTCATGTCTGGGTATGGATGTAATATCTCAGG GCAGAAATGTGATAGAAGTGAAAACCAACGCAGGCCTGCTTAGTTTGTGGA GTTGAAGCTCCACTAAGTAGGAGAAGTTGCTAGCTCTTTCGGTTTTTGAGAAA AATAAGGTCATTCCCTCC	57,63
PscSat25-190	125	190	0.0490	TAAAAATAGATTAAAGGAGAAAGCTAACTTTGAGAAGAAAATGTCAACGGA ACAAGGGATTCCAGCCAGTCTCCACGCTGGTACTTGCCTTGCTGAAGCTG TTTACCTGCTGCGATCTGACGAGTGCAGGGACATTCAGCTTAGAATGGCCGT GACAAGTTCACTTGTGATTTCAAGTGGTCTTAT	55,26
PmeSat1-177	1	177	1.6000	TCAAGTTGCTTCGTCCATAGGAATGAATGGGGAGGCAAGTGAAGTGCCTTTTC TCCAAACCTGAAGAGTTACAACTCCTCCGACTTGGTGTAGCTGAAGGGTCA CGGAACAAGCCTGGCAGCGTTGAGTTTTCAATCTTTTGACATTCCTGCACCGA GATATTTACATCCGTAAC	53,11
PmeSat7-189	24	189	0.5000	CAGCATGGGAGACTGGCTGGGAATCCCTTGTTCGGTTGACACTTTTCTTCTCA AAGTTAGCTTTCTCGTTTGTATCTTTATTAATGAAGTTACTAAAATCCAGATGA ACTTGTCAACGGCCATTCTAAGCTGAATGTCCCTGCACTCGTCAAGTGCAGC CGGTACACAGCTTGAAGCAAGGCAAGTAC	54,5
PlaSat5-190	15	190	0.8900	GATTTCAAGTGGTCTTTATAAGAATGAAATTAAGGAGAAAAGCTAACTTTAAA AAGAAAAGAGTCAACAGAAACAAGGGATTCCCAGCCAGTCTCCATGCTGGTA CTTGCCTTGCCTCAAGCTGTGTAGCGGCTGCGATCTGACGAGTGCAGGGACCT TCAGCTTAGAATGGCCGTTGACTGCTTAAACTC	54,74
PlaSat8-177	23	177	0.5900	CTTGTTACGGTTGTAAATTTCTCTGTGCAGAAGTGTGACCGAACTGAAAACCT AATGCAACTAGGTGAGTTACATGACCATTACGCTCCACCAAGTCGGAGGAGT TTGTATCTCTTCAGGTTTGGGAGAAAATTCACCTACTCGCTCCCATTCATT CCTATGGAAGAAGCAACT	55,93

Table 3. RepeatMasker Abundance and Divergence (K2P%) data for PboSat2-173 and PboSat2-189 in each of *Proceratophrys* specie.

Repeat	Specie	Abundance (%)	Divergence (K2P %)
PboSat2-173	<i>P. boiei</i>	3,1231	6,63
	<i>P. schirchi</i>	0,1671	30,15
	<i>P. melanopogon</i>	0,0925	11,78
	<i>P. laticeps</i>	1,7036	17,67
PboSat3-189	<i>P. boiei</i>	0,6375	8,06
	<i>P. schirchi</i>	0,0391	14,48
	<i>P. melanopogon</i>	0,4732	14,31
	<i>P. laticeps</i>	0,6902	10,95

References

- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, [S. l.], v. 28, n. 3–4, p. 369–380, 2020.
- BUENO, G. P.; GATTO, K. P.; GAZOLLA, C. B.; LEIVAS, P. T.; STRUETT, M. M.; MOURA, M.; BRUSCHI, D. P. Cytogenetic characterization and mapping of the repetitive DNAs in *Cycloramphus bolitoglossus* (Werner, 1897): More clues for the chromosome evolution in the genus *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 1 January, p. 1–20, 2021.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, [S. l.], n. 0123456789, 2021.
- DA SILVA, M. J.; DESTRO, R. F.; GAZONI, T.; NARIMATSU, H.; PEREIRA DOS SANTOS, P. S.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, [S. l.], v. 160, n. 3, p. 141–147, 2020.
- DA SILVA, M. J.; SANTOS, M. D.; GAZONI, T.; CHOLAK, L. R.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic approaches provide evidence of a conserved diploid number and cytological differences between proceratophrys species (Anura: Odontophrynidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–11, 2021.
- DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution, **Nature**, v. 299, p. 111–7, 1982.
- DRUMMOND A.J.; ASHTON B.; CHEUNG M.; HELED J.; KEARSE M. Geneious v.4.8.5. **Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand**, 2009.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell** 12, 1069–1084, 1977.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic Genome Research**, v. 146, p. 153–170, 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230, 2017.
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, v. 11, e0156176, 2016.
- GATTO, K. P.; MATTOS, J. V.; SEGER, K. R.; LOURENÇO, L. B. Sex Chromosome Differentiation in the Frog Genus *Pseudis* Involves Satellite DNA and Chromosome Rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 301, 2018.
- GATTO, K. P.; SOUZA, L. H. B.; NASCIMENTO, J.; SUÁREZ, P.; LOURENÇO, L. B. Comparative mapping of a new repetitive dna sequence and chromosome region-specific

- probes unveiling rearrangements in an amazonian frog complex. **Genome**, [S. l.], v. 64, n. 9, p. 857–868, 2021.
- GUZMÁN, K.; ROCO, Á.S.; STÖCK, M.; RUIZ-GARCÍA, A.; GARCÍA-MUÑOZ, E.; BULLEJOS, M. Identification and characterization of a new family of long satellite DNA, specific of true toads (Anura, Amphibia, Bufonidae). **Scientific Reports**, 12, 13960 2022.
- MESTROVIC, N.; PLOHL, M.; MRAVINIC, B.; UGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* – experimental evidence for the ‘library’ hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p.1062– 1068, 1998.
- MACAS, J. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. 12, 2017.
- MILANI, D.; BARDELLA, V. B.; FERRETTI, A. B. S. M.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MELO, A. S.; MOURA, R. C.; LORETO, V.; SONG, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs Unveil Clues about the Ancestry and Composition of B Chromosomes in Three Grasshopper Species. **Genes**, v. 9, p.523, 2018.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 11, p. 1–12, 2010.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISSL, J.; MACAS, J.. RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J.. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 3745–3776, 2020.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; BARDELLA, V. B.; LEMOS, B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. **DNA Research**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 137–147, 2018.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; SONG, H.; MARTI, D. A.; LÓPEZ-LEÓN, Ma. D.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; O’NEILL, R. Eight Million Years of Satellite DNA Evolution in Grasshoppers of the Genus *Schistocerca* Illuminate the Ins and Outs of the Library Hypothesis. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 88–102, 2020.
- PEREIRA, J. A.; MILANI, D.; FERRETTI, A.B. S. M.; BARDELLA, V. B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The extensive amplification of heterochromatin in Melipona bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 251–262, 2021.
- PEZER, Z.; BRAJKOVIC, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIC, D. Transcription of satellite DNAs in insects. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 51, p. 161–78, 2011.
- PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1986.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. “Satellite DNA evolution,” in *Repetitive DNA*, ed. M. A. Garrido-Ramos. Basel: **Karger Publishers**, v.7, p.126–152, 2012.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, p. 313–325, 2014.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 61, p. 543–583, 2011.

QUESADA DEL BOSQUE, M.E.; LÓPEZ-FLORES, I.; SUÁREZ-SANTIAGO, V.N.; GARRIDO-RAMOS, M.A. Differential spreading of *Hinf*I satellite DNA variants during radiation in Centaureinae. **Annals of Botany**, v.12, p. 1793–1802, 2013.

RUIZ-RUANO F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, 28333; 2016.

RUIZ-RUANO, F. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127(3) p.323–340, 2018.

RUIZ-RUANO, F. J.; NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; CAMACHO, J. P. M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Characterization of the satellitome in lower vascular plants: The case of the endangered fern *Vandenboschia speciosa*. **Annals of Botany**, [S. l.], v. 123, n. 4, p. 587–599, 2019.

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

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite dna. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 9, 2021.

UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.) **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Springer, 2021.

UTSUNOMIA, R. DUÍLIO M. Z. d. A.; RUIZ-RUANO, F.J. *et al.* Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, p. 5856, 2019.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; DEL-GRANDE, M. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 101–107, 2011.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**, v.15, p.111, 2014.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; ZATTERA, M. L.; WEBER, L. N.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; BRUSCHI, D. P. Cytogenetic and genetic data support *Crossodactylus aeneus* Müller, 1924 as a new junior synonym of *C. gaudichaudii* Duméril and Bibron, 1841 (Amphibia, Anura). **Genetics and Molecular Biology**. Mar 22;44(2): e20200301, 2021.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; LEITCH, A.R.; MCCANN, J.; JANG, T.S.; MACAS, J. Employing next generation sequencing to explore the repeat landscape of the plant genome. In: Hörandl E, Appelhans M, eds. *Next generation sequencing in plant systematics*. Königstein, Germany: Koeltz Scientific Books, p.155–179, 2015.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados gerados para as sequências repetitivas do tipo DNA satélite apresentados neste trabalho confirmam a presença dos satélites PboSat2-173 e PboSat3-189 nas três espécies estudadas do gênero *Proceratophrys*, caracterizados em *P. boiei*, corroborando com a hipótese da biblioteca (FRY; SALSER, 1977). A similaridade encontrada para o PboSat3-189 com o satélite PcP190, evidencia o compartilhamento deste tipo de sequência entre anfíbios anuros e revela a importância de estudos em mais espécies do gênero *Proceratophrys*, em outros gêneros e em outros grupos de anfíbios para o melhor conhecimento acerca dos mecanismos evolutivos que envolvem DNA satélite e assim prover mais dados para o melhor entendimento da evolução destas sequências e do possível papel que esta pode estar exercendo nos genomas desses sapos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, R. C.; CARNAVAL, A. C. Q.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M. T. Demographic process in montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 880–888, 2012.
- AMARO, R. C.; PAVAN, D.; RODRIGUES, M. T. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim & Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). **Zootaxa**, v. 2071, p. 61–68, 2009.
- ANANIAS, F.; MODESTO, A. D. S.; MENDES, S. C.; NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas**, v. 144, p. 206–212, 2007.
- BALDISSERA, F. A. JR.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335–345, 1993.
- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, [S. l.], v. 28, n. 3–4, p. 369–380, 2020.
- BISCOTTI, M.A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J.S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415–420, 2015
- BRANDÃO, R. A.; VAZ-SILVA, W.; CARAMASCHI, U.; FRANÇOZO, R. D. New distribution records of *Proceratophrys vielliardi* Martins & Giaretta 2011 (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Herpetology Notes**, v. 5, p. 223–225, 2012.
- BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. **Science**, v.161, p. 529–540, 1968.
- BUENO, G. P.; GATTO, K. P.; GAZOLLA, C. B.; LEIVAS, P. T.; STRUETT, M. M.; MOURA, M.; BRUSCHI, D. P. Cytogenetic characterization and mapping of the repetitive DNAs in *Cycloramphus bolitoglossus* (Werner, 1897): More clues for the chromosome evolution in the genus *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 1 January, p. 1–20, 2021.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, [S. l.], n. 0123456789, 2021.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; ZRZAVÁ, M.; KUBÍČKOVÁ, S.; RENDÓN, P.; MAREC, F. The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 12, n. March, p. 1–15, 2021.
- CREPALDI, C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 38–46, 2020.
- CREPALDI, C.; MARTÍ, E.; GONÇALVES, É. M.; MARTÍ, D. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Genomic Differences Between the Sexes in a Fish Species Seen Through Satellite DNAs. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 12, n. September, p. 1–11, 2021.

- CRUZ, C. A. G.; NUNES, I.; JUNCA, F. Redescription of *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883) (Amphibia, Anura, Odontophrynidae), with description of two new species without eyelid appendages from Northeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, p. 110–122, 2012.
- DA SILVA, M. J.; DESTRO, R. F.; GAZONI, T.; NARIMATSU, H.; PEREIRA DOS SANTOS, P. S.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, [S. l.], v. 160, n. 3, p. 141–147, 2020.
- DA SILVA, M. J.; SANTOS, M. D.; GAZONI, T.; CHOLAK, L. R.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic approaches provide evidence of a conserved diploid number and cytological differences between proceratophrys species (Anura: Odontophrynidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–11, 2021.
- DIAS, P. H.; DOS, S.; AMARO, R. C.; DE CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; RODRIGUES, M. T. Two new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura; Odontophrynidae) from the Atlantic forest, with taxonomic remarks on the genus. **Zootaxa**, v. 3682, p. 277–304, 2013.
- DIAS, P. H.; DOS, S.; AMARO, R. C.; DE CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; RODRIGUES, M. T. Two new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura; Odontophrynidae) from the Atlantic forest, with taxonomic remarks on the genus. **Zootaxa**, v. 3682, p. 277–304, 2013.
- DOS SANTOS, R. Z.; CALEGARI, R. M.; SILVA, D. M. Z. d. A.; RUIZ-RUANO, F. J.; MELO, S.; OLIVEIRA, C.; FORESTI F.; ULIANO-SILVA M.; PORTO-FORESTI, F.; UTSONOMIA, R. A Long-Term Conserved Satellite DNA That Remains Unexpanded in Several Genomes of Characiformes Fish Is Actively Transcribed. **Genome biology and evolution**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1–16, 2021.
- DOVER, G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution, **Nature**, v. 299, p. 111–7, 1982.
- DOVER, G. Molecular drive. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 587–9, 2002.
- DRUMMOND A.J.; ASHTON B.; CHEUNG M.; HELED J.; KEARSE M. Geneious v.4.8.5. **Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand**, 2009.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- FERRETTI, A. B. S. M.; MILANI, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; RUIZ-RUANO, F. J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High dynamism for neo-sex chromosomes: satellite DNAs reveal complex evolution in a grasshopper. **Heredity**, [S. l.], v. 125, n. 3, p. 124–137, 2020.
- FROST DR. Amphibian Species of the World: an On- line Reference. Version 6.0 (10/05/2022). Eletron- ic Database accessible at American Museum of Natural History, New York, USA, 2022. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.html>>
- FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences ofHS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell** 12, 1069–1084, 1977.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic Genome Research**., v. 146, p. 153–170, 2015.

- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230, 2017.
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, v. 11, e0156176, 2016.
- GATTO, K. P.; MATTOS, J. V.; SEGER, K. R.; LOURENÇO, L. B. Sex Chromosome Differentiation in the Frog Genus *Pseudis* Involves Satellite DNA and Chromosome Rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 301, 2018.
- GATTO, K. P.; SOUZA, L. H. B.; NASCIMENTO, J.; SUÁREZ, P.; LOURENÇO, L. B. Comparative mapping of a new repetitive dna sequence and chromosome region-specific probes unveiling rearrangements in an amazonian frog complex. **Genome**, [S. l.], v. 64, n. 9, p. 857–868, 2021.
- GODINHO, L. B.; MOURA, M. R. D.; DE LACERDA, J. V. A.; FEIO, R. N. A new species of *Proceratophrys* (Anura: Odontophrynidae) from the middle São Francisco River, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 49, p. 63–73, 2013.
- GORDON, A. AND HANNON, G. J. Fastx-toolkit, FASTQ/A short-reads pre-processing tools. Não publicado, acessado 16/03/2020, disponível em: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit, 2010.
- GUZMÁN, K.; ROCO, Á.S.; STÖCK, M.; RUIZ-GARCÍA, A.; GARCÍA-MUÑOZ, E.; BULLEJOS, M. Identification and characterization of a new family of long satellite DNA, specific of true toads (Anura, Amphibia, Bufonidae). **Scientific Reports**, 12, 13960 2022.
- HALL, S.E.; LUO, S.; HALL, A.E.; PREUSS, D. Differential rates of local and global homogenization in centromere satellites from Arabidopsis relatives. **Genetics** v. 170, p. 1913–1927, 2005.
- JAILLON, O. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. **Nature**. V. 431, p. 946–957, 2004.
- JUNIER, T.; PAGNI, M. Dotlet: diagonal plots in a web browser. **Bioinformatics**, v. 16, p. 178–9, 2000.
- KING, M. Amphibia. IN: JOHN, B. **Animal Cytogenetics. Amphibia**, 4. **Chordata** 2. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990.
- KIT, S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.711–716, 1961.
- KUO, Y. T.; ISHII, T.; FUCHS, J.; HSIEH, W. H.; HOUBEN, A.; LIN, Y. R. The Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA and Its Impact on the Genome Diversification in the Genus Sorghum. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 12, n. August, 2021.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anurans amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v. 39, p 83-127, 1990.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. “The repetitive DNA content of eukaryotic genomes,” in *Repetitive DNA*, ed. M. A. Garrido-Ramos, Basel: **Karger Publishers**, v.7, p. 1–28, 2012.
- MACAS, J. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v.45, e111, 2017.

- MAGALHÃES, F. de M.; BRANDÃO, R. A.; GARDA, A. A.; MÂNGIA, S. Revisiting the generic position and acoustic diagnosis of *Odontophrynus salvatori* (Anura: Odontophrynidae). **Herpetological Journal**, v.30(4), p. 189-196, 2020.
- MÂNGIA, S.; KOROIVA, R.; NUNES, P. M. S.; ROBERTO, I. J.; ÁVILA, R. W.; SANT'ANNA, A. C.; SANTANA, D. J.; GARDA, A. A. A new species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe Plateau, Ceará State, northeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 74, p. 255–268, 2018.
- MÂNGIA, S.; OLIVEIRA, E. F.; SANTANA, D. J.; KOROIVA, R.; PAIVA, F.; GARDA, A. A. Revising the taxonomy of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 1151–1172, 2020.
- MÂNGIA, S.; SANTANA, D. J.; CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia. Rio de Janeiro**, v. 531, p. 1–33, 2014.
- MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from central Brazil. **Zootaxa**, v. 2880, p. 41–50, 2011.
- MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. Morphological and acoustic characterization of *Proceratophrys goyana* (Lissamphibia: Anura: Odontophrynidae), with the description of a sympatric and related new species. **Zootaxa**, v. 3750, p. 301–320, 2013.
- MATA-SUCRE, Y.; SADER, M.; VAN-LUME, B.; GAGNON, E.; PEDROSA-HARAND, A.; LEITCH, I. J.; LEWIS, G. P.; SOUZA, G. How diverse is heterochromatin in the Caesalpinia group? Cytogenomic characterization of *Erythrostemon hughesii* Gagnon & G.P. Lewis (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Planta**, [S. l.], v. 252, n. 4, p. 1–14, 2020.
- MCCANN, J.; MACAS, J.; NOVÁK, P.; STUESSY, T. F.; VILLASEÑOR, J. L.; WEISS-SCHNEEWEISS, H. Differential Genome Size and Repetitive DNA Evolution in Diploid Species of *Melampodium* sect. *Melampodium* (Asteraceae). **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 11, n. March, p. 1–14, 2020.
- MELTERS, D. P.; BRADNAM, K. R.; YOUNG, H. A.; TELIS, N.; MAY, M. R.; RUBY, J. G., *et al.* Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome biology and evolution**. 14:R10, 2013.
- MESTROVIC, N.; PLOHL, M.; MRAVINIC, B.; UGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* – experimental evidence for the ‘library’ hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p.1062– 1068, 1998.
- MILANI, D.; BARDELLA, V. B.; FERRETTI, A. B. S. M.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MELO, A. S.; MOURA, R. C.; LORETO, V.; SONG, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs Unveil Clues about the Ancestry and Composition of B Chromosomes in Three Grasshopper Species. **Genes**, v. 9, p.523, 2018.
- MILANI, D.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Out

of patterns, the euchromatic B chromosome of the grasshopper *Abracris flavolineata* is not enriched in high-copy repeats. **Heredity**, [S. l.], v. 127, n. 5, p. 475–483, 2021.

NAPOLI, M. F.; CRUZ, C. A. G.; ABREU, R. O.; DEL-GRANDE, M. L. A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) from the Chapada Diamantina, State of Bahia, northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3133, p. 37–49, 2011.

NASCIMENTO, M. *et al.* PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. **Bioinformatics** 33, 128–129, 2016.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 11, p. 1–12, 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**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013.

NOVÁK, P.; ROBLDILLO, L. Á.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; VRBOVÁ, I.; NEUMANN, P.; MACAS, J. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. 12, 2017.

NOVÁK, P.; ÁVILA R. P.; KOBLIZKV, A.; VRBOVÁ, I.; NEUMANN, P.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; DIAS, G. B.; DE LIMA, L. G.; KUHN, G. C. S.; RAMOS, É.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, v. 7(1), p. 6422, 2018.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J.. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 3745–3776, 2020.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; BARDELLA, V. B.; LEMOS, B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. **DNA Research**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 137–147, 2018.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; SONG, H.; MARTI, D. A.; LÓPEZ-LEÓN, Ma. D.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; O'NEILL, R. Eight Million Years of Satellite DNA Evolution in Grasshoppers of the Genus *Schistocerca* Illuminate the Ins and Outs of the Library Hypothesis. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 88–102, 2020.

PEREIRA, J. A.; MILANI, D.; FERRETTI, A.B. S. M.; BARDELLA, V. B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The extensive amplification of heterochromatin in Melipona bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, [S. l.], v. 130, n. 4, p. 251–262, 2021.

PEZER, Z.; BRAJKOVIC, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIC, D. Transcription of satellite DNAs in insects. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 51, p. 161–78, 2011.

PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1986.

- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. “Satellite DNA evolution,” in *Repetitive DNA*, ed. M. A. Garrido-Ramos. Basel: **Karger Publishers**, v.7, p.126–152, 2012.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, p. 313–325, 2014.
- PRADO, G. M.; POMBAL, J.P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39 p. 1-85, 2008.
- PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 61, p. 543-583, 2011.
- QUESADA DEL BOSQUE, M.E.; LÓPEZ-FLORES, I.; SUÁREZ-SANTIAGO, V.N.; GARRIDO-RAMOS, M.A. Differential spreading of HinfI satellite DNA variants during radiation in Centaureinae. **Annals of Botany**, v.12, p. 1793–1802, 2013.
- RUIZ-RUANO F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, 6, 28333; 2016.
- RUIZ-RUANO, F. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127(3) p.323-340, 2018.
- RUIZ-RUANO, F. J.; NAVARRO-DOMÍNGUEZ, B.; CAMACHO, J. P. M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Characterization of the satellitome in lower vascular plants: The case of the endangered fern *Vandenboschia speciosa*. **Annals of Botany**, [S. l.], v. 123, n. 4, p. 587–599, 2019.
- SANTANA, D. J.; MÂNGIA, S.; DA SILVA ALVES SACCOL, S.; DOS SANTOS, T. G. A new species of proceratophrys miranda-ribeiro, 1920 (Anura, Odontophrynidae) of the *P. bigibbosa* species group from Southern Brazil. **Vertebrate Zoology**, [S. l.], v. 71, p. 387–401, 2021.
- SCHINDELHAUER, D.; SCHWARZ, T. Evidence for a fast, intrachromosomal conversion mechanism from mapping of nucleotide variants within a homogeneous α -satellite DNA array. **Genome Research**. v.12, p.1815–1826, 2002.
- SINGER, M. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **Journal of Cytology**, v. 76, p. 67–112 1982.
- SMIT, A.F.A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. RepeatMasker Open-4.0. Disponível em: <http://www.repeatmasker.org>.
- SUEOKA, N. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: A compilation of old and new data. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.31–40, 1961.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

- TEIXEIRA, M.; AMARO, R. C.; RECODER, R. S.; DAL VECHIO, F.; RODRIGUES, M. T. A new dwarf species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Cycloramphidae) from highlands of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3551, p. 25–42, 2012.
- THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite dna. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 9, 2021.
- UGARKOVIĆ, Đ.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5955–5959, 2002.
- UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.) **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Springer, 2021.
- UTSUNOMIA, R. DUÍLIO M. Z. d. A.; RUIZ-RUANO, F.J. *et al.* Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, p. 5856, 2019.
- VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; DEL-GRANDE, M. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 101–107, 2011.
- VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**, v.15, p.111, 2014.
- VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; ZATTERA, M. L.; WEBER, L. N.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; BRUSCHI, D. P. Cytogenetic and genetic data support *Crossodactylus aeneus* Müller, 1924 as a new junior synonym of *C. gaudichaudii* Duméril and Bibron, 1841 (Amphibia, Anura). **Genetics and Molecular Biology**. Mar 22;44(2): e20200301, 2021.
- WAYE, J.S.; WILLARD, H.F. Human beta satellite DNA: Genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v. 86, p. 6250–6254, 1989.
- WEI, K.H.C.; GRENIER, J.K.; BARBASH, D.A.; CLARK, A.G. Correlated variation and population differentiation in satellite DNA abundance among lines of *Drosophila melanogaster*. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, USA, v. 111, p.18793–18798, 2014.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; LEITCH, A.R.; MCCANN, J.; JANG, T.S.; MACAS, J. Employing next generation sequencing to explore the repeat landscape of the plant genome. In: Hörandl E, Appelhans M, eds. *Next generation sequencing in plant systematics*. Königstein, Germany: Koeltz Scientific Books, p.155–179, 2015.