
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEONARDO H. A. DE OLIVEIRA

**Variabilidade intragenômica de distintos DNAs satélites entre
cromossomos A e B do gafanhoto *Abracris flavolineata***



Rio Claro
2018

LEONARDO H. A. OLIVEIRA

Variabilidade intragenômica de distintos DNAs satélites entre cromossomos A e B do gafanhoto *Abracris flavolineata*

Orientador: Prof. Dr. Diogo C. Cabral-de-Mello

Co-orientador: Me. Diogo Milani

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2018

O48v

Oliveira, Leonardo Henrique Alves de

Variabilidade intragenômica de distintos DNAs satélites entre cromossomos A e B do gafanhoto *Abracris flavolineata* / Leonardo Henrique Alves de Oliveira. – Rio Claro, 2018

31 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas)
- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Coorientador: Diogo Milani

1. Citogenética Animal. 2. Cromossomo B. 3. DNA satélite. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que, por Sua graça, tem me acompanhado a cada dia, e, por isso, de nada tenho falta, pois, além de tudo, me concedeu saúde, forças, ânimo, capacidade e colocou próximo a mim pessoas que sempre me ajudaram e me apoiaram.

Aos meus familiares, especialmente meus pais, irmã e minha esposa, que me deram suporte em tudo e durante todos os momentos para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a todos do grupo de pesquisa que me ajudaram na realização deste trabalho, especialmente ao meu orientador, Diogo Cabral, e ao meu coorientador, Diogo Milani, que me nortearam durante a execução e escrita deste projeto.

Aos meus amigos Guilherme, Ana, Melissa, Mileni e Samantha, que ganhei ao longo desses anos e que dividiram momentos de risos e de dificuldades, mas que, juntos, superamos tudo, formando, assim, uma bela história.

Resumo

Cromossomos B (Bs) são elementos adicionais ao cariótipo dos genomas de inúmeros eucariotos. Não possuem homólogos e não se recombinaem, e não seguem o padrão mendeliano de segregação, tendendo a se acumularem na linhagem germinativa. Grande parte do DNA desses elementos (Bs) é composta por DNA satélites (DNAsat), que são sequências repetidas, organizadas em tandem (justapostas) e em agrupamentos (clusters). Os DNAs satélites evoluem por mecanismo de "evolução em concerto", causando uma homogeneização das sequências. Uma das espécies na qual foi relatado a presença de Bs é o gafanhoto *Abracris flavolineata*, havendo casos de indivíduos com um ou mais desses elementos. Nesta espécie os Bs foram caracterizados como sub-metacêntricos e sua origem foi relacionada, possivelmente, ao cromossomo 1. No presente trabalho aprofundamos o conhecimento sobre a estrutura, organização, padrões de evolução e variabilidade intragenômica de cinco distintos DNAs satélites no complemento A e no cromossomo B da espécie. Para isso, recuperamos sequências dos cinco DNAsat de ambos materiais genéticos (0B e μ B) a partir da amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento nucleotídico e analisamos sua variabilidade. Foram geradas árvores de distância comparativa entre os genomas para cada sequência de DNAsat, constatando que as sequências advindas do μ B apresentaram maior variabilidade entre si do que aquelas dos cromossomos A, que já estão mais homogeneizadas, o que reflete a evolução independente do cromossomo B, levando à um distanciamento em relação aos As. Nas árvores de distância é possível observar agrupamentos bem separados de sequências do complemento A e do cromossomo B.

Palavras-chave: cromossomo supranumerário, DNAs repetitivos, genoma, evolução

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	7
1.1.Cromossomos B.....	7
1.2.DNAs satélites	8
2.OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1.Material biológico, extração de DNA e obtenção do cromossomo B	11
3.2.DNAs satélites e Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	12
3.3.Clonagem, sequenciamento e análise das sequências	12
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	23

1. Introdução

1.1 Cromossomos B

Descobertos há mais de um século, por Wilson (1907), os cromossomos B (Bs), acessórios ou supernumerários são elementos extras presentes no cariótipo de uma grande variedade de espécies de plantas, animais e fungos. São cromossomos dispensáveis à viabilidade e desenvolvimento normal dos organismos. Esses cromossomos não possuem homólogos, não se recombina com os elementos do complemento A (complemento normal) e não obedecem ao padrão mendeliano de segregação. São transmitidos à próxima geração em uma frequência que excede os 50% esperados, observados nos demais cromossomos, de acordo com o padrão Mendeliano de segregação (RUBAN et al., 2017; HOUBEN et al., 2013). Em algumas populações estes cromossomos, apesar de serem prescindíveis ao genoma e ao organismo, em diversos casos podem exercer influência na evolução do genoma, como por exemplo em gafanhotos da espécie *Myrmeleotettix maculatus*, em que a presença de Bs foi correlacionada ao aumento da frequência e distribuição de quiasmas entre os cromossomos normais do genoma (cromossomos A; As), que reflete no aumento das recombinações genéticas (CAMACHO et al., 2000; HEWITT; JOHN, 1967; CAMACHO et al., 1980).

A origem dos cromossomos B pode ser intraespecífica (do genoma do próprio hospedeiro) ou através de hibridização interespecífica. Em razão da forma de segregação e ausência de recombinação, os Bs têm sua própria evolução, que independe dos cromossomos A, podendo sofrer efeito deletério pelo acúmulo em excesso de mutações (efeito Catraca de Muller), ou acumular-se em uma linhagem ao longo do tempo, e, quando em grande número, podem inclusive comprometer a fertilidade e crescimento do indivíduo (GREEN, 1990; CAMACHO et al., 2000; BEUKEBOOM, 1994; HOUBEN et al., 2013). Em algumas espécies, por exemplo *Zea mays*, pode-se observar um número de Bs excedendo ao de cromossomos As ($2n = 20 \text{ As} + 0\text{-}34 \text{ Bs}$) (HOUBEN et al., 2013). A variação desses cromossomos pode ocorrer, ainda, entre tecidos de um mesmo organismo, por exemplo nas gramíneas *Aegilops speltoides* e *Aegilops mutica*, espécies em que os Bs podem ocorrer nas partes aéreas, e estarem ausentes nas raízes (MENDELSON; ZOHARY, 1972; OHTA,

1996). Em gafanhotos, a variação pode dar-se entre folículos dos testículos, que, durante a espermatogênese, o cromossomo B pode vir a segregar ou não às células filhas (NUR, 1969; KAYANO, 1971; LÓPEZ-LEÓN, et al., 1996; CABRERO et al., 2017).

Desde sua descoberta, esse elemento foi relatado em aproximadamente 15% das espécies de eucariotos cariotipadas (CAMACHO, 2005). Entre os insetos há uma ampla ocorrência de Bs, tendo sido observados entre os mais diversos grupos como por exemplo em Hymenoptera, as espécies *Tetragonisca latreille* (BARTH et al. 2011) e *Partamona helleri* (BRITO et al., 1997). Na ordem Coleoptera, em diversas superfamílias, das quais pode-se citar como exemplo os escarabeídeos *Dichotomius geminatus* (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010) e *Coprophanaeus cyanescens* (OLIVEIRA et al., 2012). Como destaque, porém, tem-se a ordem Orthoptera, que está entre os organismos que tiveram maior quantidade de espécies relatadas portadoras de cromossomos B (CAMACHO et al., 2000), geralmente não apresentando uma frequência uniforme. Dentre as superfamílias dessa ordem sobressaem-se Pyrgomorphoidea (32.3% das espécies contendo Bs), Grylloidea (14.9%), Acridoidea (14.6%) e Tetrigoidea (14.3%) (PALESTIS et al., 2010).

Na espécie *Abracris flavolineata*, pertencente à superfamília Acridoidea, a presença de cromossomos Bs foi descrita primeiramente por Cella e Ferreira (1991). Análises posteriores, e ainda em andamento, têm como objetivo elucidar, por exemplo, a composição, evolução, origem e função desses elementos (MENEZES-DE-CARVALHO et al., 2015; MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2014; MILANI et al., 2017; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2014). O cromossomo B da espécie é sub-metacêntrico na população de Rio Claro/SP, e foram observados indivíduos com um ou dois destes elementos. Sua origem pode estar relacionada ao cromossomo autossômico (par 1), devido ao compartilhamento de clusters de U2 snDNA entre ambos (BUENO et al., 2013; MENEZES-DE-CARVALHO et al., 2015).

1.2 DNAs satélites

Em muitas espécies, tanto de animais quanto vegetais, os Bs têm sido frequentemente identificados portando denso conteúdo de DNAs satélites (DNAsat), tendo sido muitas vezes estes cromossomos maiores do que os

encontrados no genoma que deu origem ao elemento (CAMACHO, 2000). DNAsat são sequências que podem apresentar de poucas bases até centenas delas, que se repetem, estando organizadas em tandem (justapostas) e em agrupamentos (clusters) de várias repetições, localizadas, principalmente, nas regiões pericentromérica e/ou telomérica dos cromossomos (CHARLESWORTH et al., 1994). Estão presentes geralmente na heterocromatina e em alguns casos na eucromatina (KUHN, 2015; RUIZ-RUANO et al., 2016), compondo uma parte considerável do DNA de eucariotos. (PALOMEQUE; LORITE, 2008). Em estudos voltados para a evolução dos DNAsat, dois dos parâmetros mais observados são a variação na sequência nucleotídica e número de cópias, podendo ter origem interespecífica ou intraespecífica (UGARKOVIĆ, 2005). Alto grau de variabilidade entre esses parâmetros ocorrem mesmo entre espécies filogeneticamente muito próximas, e até mesmo entre sub-espécies (ROSS et al., 1997). Em certos casos, a diversidade observada entre a quantidade de cópias pode ser completamente discrepante, podendo haver espécies com inúmeras repetições de um satélite e outras espécies, de mesmo gênero, com quantidades quase insignificantes de tais sequências (SLAMOVITS, et al., 2001). De acordo com a hipótese da biblioteca de DNA satélite (FRY; SALSER, 1977), organismos relacionados apresentam uma "biblioteca" de sequências similares de DNAsat, a partir da qual, uma das variantes desse conjunto é estocasticamente selecionada e passa por uma evolução que se dá em três etapas: (1) origem, (2) disseminação e (3) amplificação, formando DNAsat abundante, e amplamente distribuído pelo genoma (RUIZ-RUANO et al., 2016). Mesmo que haja uma aparente falta de conservação entre as famílias de DNAsat, dentro de cada família de DNAsat as sequências tendem a manter similaridade entre si, através da chamada "evolução em concerto", um processo biológico mediado por eventos de recombinação, mecanismos de reparo e replicação, conversões gênicas e *crossing-over* desigual (LIAO, 1999; ELDER; TURNER, 1995; GANLEY; KOBAYASHI, 2007). O resultado da "evolução em concerto" é a homogeneização das repetições dos DNAsat. Apesar desse mecanismo influenciar a grande maioria dos processos de amplificação de DNAsat, certos casos não obedecem essa regra, apresentando maior variabilidade entre as sequências, até mesmo dentro de um mesmo indivíduo (HARPKE;

PETERSON, 2006; ZHENG et al., 2008; KELLER et al., 2006). No entanto, embora haja tais variações, o mecanismo de "evolução em concerto" prevalece sobre a amplificação de DNA repetitivos, e talvez um dos exemplos mais notáveis de conservação seja o DNAsat que apresentou uma intensa conservação entre espécies extremamente distantes, como no caso, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens* (ABAD et al., 1992). Em relação a origem de DNAsat, rearranjos cromossômicos podem também estar envolvidos no surgimento e amplificação das repetições. Eventos de alterações menores como duplicação, mutações pontuais, deleções e conversão gênica são exemplos de rearranjos que estão frequentemente implicados em evolução de satélites. A partir da análise desses eventos, é possível estabelecer as relações evolutivas entre dois satélites, definindo qual teria surgido primeiro e a ordem dos processos que levou à formação do segundo (UGARKOVIĆ et al., 1996).

Por algum tempo não se conhecia as funções dos DNAs repetitivos, uma vez que no geral não são codificadores e não contribuíam para o fenótipo do organismo, e que, em teoria, competiam com as sequências de DNA codificadoras (OHNO, 1972; ORGEL; CRICK, 1980). Porém com o passar do tempo começou-se a identificar funções relacionadas à essas sequências, por exemplo na heterocromatina, da qual são os principais constituintes. A heterocromatina tem importante papel no estabelecimento e manutenção das regiões centromérica, telomérica e sub-telomérica, além de atuarem como gatilho na montagem do cinetócoro e de assegurarem que as coesinas serão recrutadas em quantidade suficiente para que haja uma segregação correta da cromátides, o que as torna fundamentais para esse evento e, consequentemente, para uma correta formação das células filhas (PALOMEQUE; LORITE, 2008; PIDOUX; ALLSHIRE, 2005). Além disso, hoje se conhece influência dos DNAs repetitivos na regulação da expressão gênica (FELICIELLO et al. 2015). Sua atuação como sinal epigenético para organização da heterocromatina durante a embriogênese também já foi mencionado, bem como sua ação na modulação de respostas à estresses exercidos pelo meio (PEZER et al., 2012).

Adicionalmente, como já foi visto para cromossomos A, os satélites têm importante papel em estudos voltados para a origem, evolução e

diferenciação dos cromossomos B (VICARI et al., 2011; CABRERO et al., 2003; ARTONI et al., 2006). Os cromossomos B de várias espécies já foram reportados apresentando uma alta densidade de satélites, a exemplo do gafanhoto *Locusta migratoria*, cujos Bs analisados exibiram mais de 65% de seu DNA representado por DNAsat, sendo apenas um tipo responsável por 55% desse total (RUIZ-RUANO et al., 2018). O gafanhoto *Abracris flavolineata* possui cromossomos B contendo grande quantidade de DNA microssatélite em contraste com a baixa quantidade de DNAs satélites localizados somente no centrômero e telômero, tornando este elemento um intrigante objeto de estudo. (MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2014; MILANI et al., 2017; MILANI et al., em preparação). Trabalhos contendo análises de variabilidade intragenômica de sequências satélites são essenciais devido à sua importância na elucidação de padrões de origem e processos envolvidos na organização, amplificação e dispersão dessas sequências pelo genoma. Se tratando de cromossomos B, pesquisas envolvendo tal variabilidade ainda são escassas, deixando uma lacuna nesses assuntos.

2. Objetivos

Aprofundar o conhecimento sobre a estrutura, organização, padrões de evolução e variabilidade intragenômica de distintos DNAs satélites no complemento A e cromossomo B e entre estes cromossomos do gafanhoto *Abracris flavolineata*.

3. Materiais e métodos

3.1. Material biológico, extração de DNA e obtenção do cromossomo B

Foram utilizados espécimes machos adultos (indivíduos 0B) de *Abracris flavolineata* coletados na região de Rio Claro/SP (São Paulo) no campus da UNESP e se encontram armazenados à -20 °C, imersos em etanol absoluto para extração do DNA genômico (gDNA). Os DNAs genômicos foram extraídos pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e armazenados em freezer -20 °C. O DNA específico do cromossomo B foi previamente isolado pela técnica de microdissecção (MENEZES-DE-CARVALHO et al., 2015).

3.2. DNAs satélites e Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os DNAs satélites selecionados para este estudo foram previamente procurados e isolados pela análise de sequências repetitivas nos genomas sequenciados de um indivíduo não portador de cromossomos B e um indivíduo portador de um cromossomo B (MILANI et al., em preparação). Os genomas foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina Miseq paired-end (2x300) e os *reads* obtidos do sequenciamento foram então utilizados para montagem e clusterização baseada em gráficos pelo programa RepeatExplorer (NOVÁK et al., 2013). Posteriormente, as sequências de DNA satélites mais abundantes foram procuradas manualmente pelo Geneious v4.8 (DRUMMOND et al., 2009), nas quais cinco foram selecionadas e empregadas para construção de primers. Os pares de primers dos cinco DNAs satélites (MILANI et al., em preparação) foram usados para amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o DNA genômico e do cromossomo B microdissectado. Para cada satélite a PCR foi executada utilizando DNA proveniente do cromossomo B e do complemento A. A reação seguiu os passos corriqueiros, partindo da desnaturação do DNA à 94°C por 5 min., seguido por 30 ciclos à 94°C por 30s, 53°C-60°C por 30s e 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% e os monômeros dos respectivos DNA satélites foram purificados pelo kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.3. Clonagem, sequenciamento e análise das sequências

Para clonagem dos produtos de PCR purificados, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) com as células competentes DH5α *Escherichia coli*. Os clones positivos foram isolados utilizando os primers universais M13 (F 5'CCAGTCACGACGTTGTAAAACG e R 5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGG) e sequenciados pela companhia Macrogen Inc. (Korea). As sequências dos DNA satélites obtidas do sequenciamento foram primeiramente tratadas com o programa Vecscreen

para exclusão dos vetores de clonagem e posteriormente analisadas com o programa Geneious (DRUMMOND et al., 2009). Seguidamente, as sequências foram agrupadas para checar o polimorfismo de DNA e reconhecimento de haplótipos pela ferramenta DnaSP v.5.10.01 tool (LIBRADO; ROZAS, 2009). Foram construídas árvores de distância (neighbor joining) para cada um dos cinco DNAs satélites pelo programa MEGA6 (<http://www.megasoftware.net>) para visualizar a relação das sequências obtidas do genoma não portador de cromossomos B e do cromossomo B microdissectado.

4. Resultados

Foram recuperadas da clonagem de cada um dos cinco DNAsat estudados ao menos 15 sequências obtidas de cromossomo B microdissectado (μ B) e do DNA genômico 0B (gDNA). Apenas um dos satélites analisados (CL204) foi recuperado uma menor quantidade devido a dificuldade de obtenção de suas repetições possivelmente por apresentar um menor tamanho em relação aos outros (75 pb). O conteúdo G+C variou de 32,9-55,3 no gDNA, e no μ B esta variação foi de 33,6-46,7 (Tabela 1). Quanto à diversidade nucleotídica, notou-se, de forma geral, um maior ou igual número para o gDNA em relação ao μ B-DNA, apesar de dois satélites não terem apresentado o mesmo padrão (CL24 e CL220) (Tabela 1). Da mesma forma, para os DNAsat CL24 e CL220 notou-se um maior número de mutações e sítios variáveis para as sequências advindas do μ B (Tabela 1).

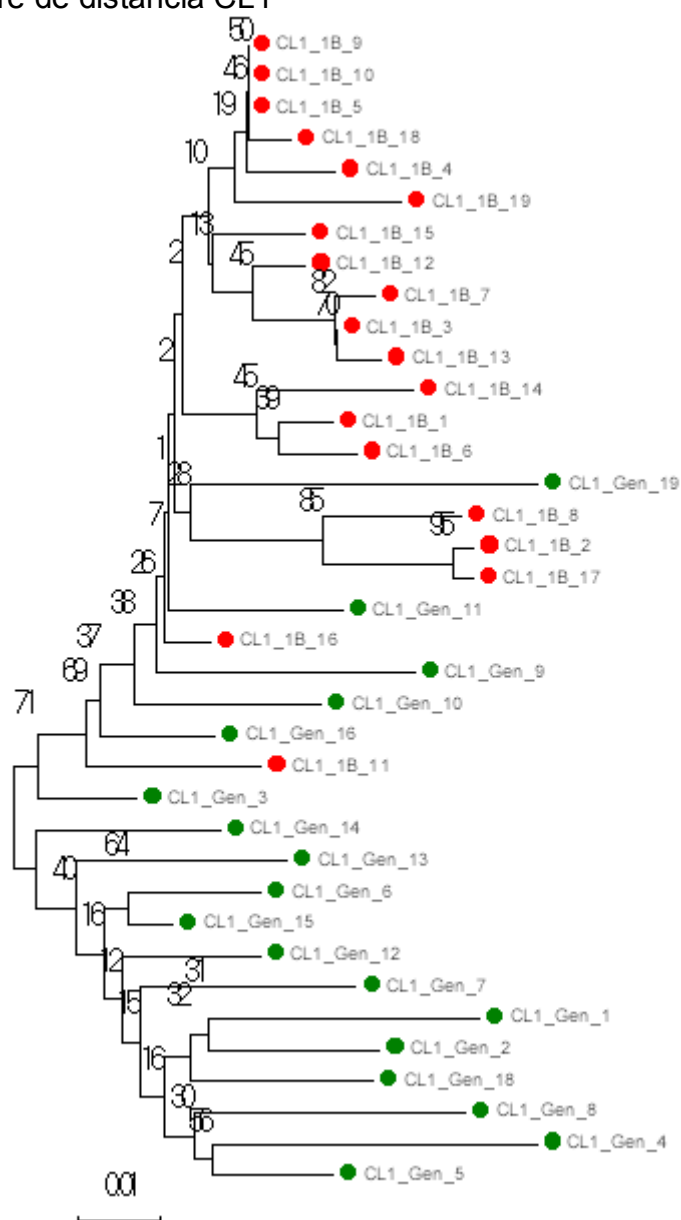
Em relação ao número de haplótipos observou-se que três dos DNAsat (CL1, CL24 e CL 204) apresentaram maior número de haplótipos para o μ B. O DNAsat CL76 apresentou maior número de haplótipos para o gDNA, embora seja similar ao observado no μ B. Por outro lado, o DNAsat CL220 foi muito mais variável na amostra gDNA (Tabela 1).

Tabela 1. Polimorfismo dos DNA satélites em indivíduos 0B e μ B-DNA de *A. flavolineata*.

	CL1		CL24		CL76		CL204		CL220	
	0B	μ B	0B	μ B	0B	μ B	0B	μ B	0B	μ B
Número de sequências	18	17	18	18	18	15	6	11	19	16
Número de haplótipos	2	15	10	16	18	14	4	8	17	3
Número de sítios	181	180	149	149	187	187	76	75	154	152
Número de sítios variáveis	64	28	18	30	36	27	59	25	32	71
Número de mutações	77	32	18	34	41	29	59	28	36	89
G + C %	43,6	44,4	32,9	33,6	40,1	40,1	55,3	46,7	46,1	45,1
Diversidade nucleotídica (π)	0,07	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03	0,39	0,15	0,05	0,25
Desvio padrão (π)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02
Diversidade haplótipos (Hd)	0,5	0,98	0,85	0,98	1	0,99	0,8	0,93	0,98	0,69

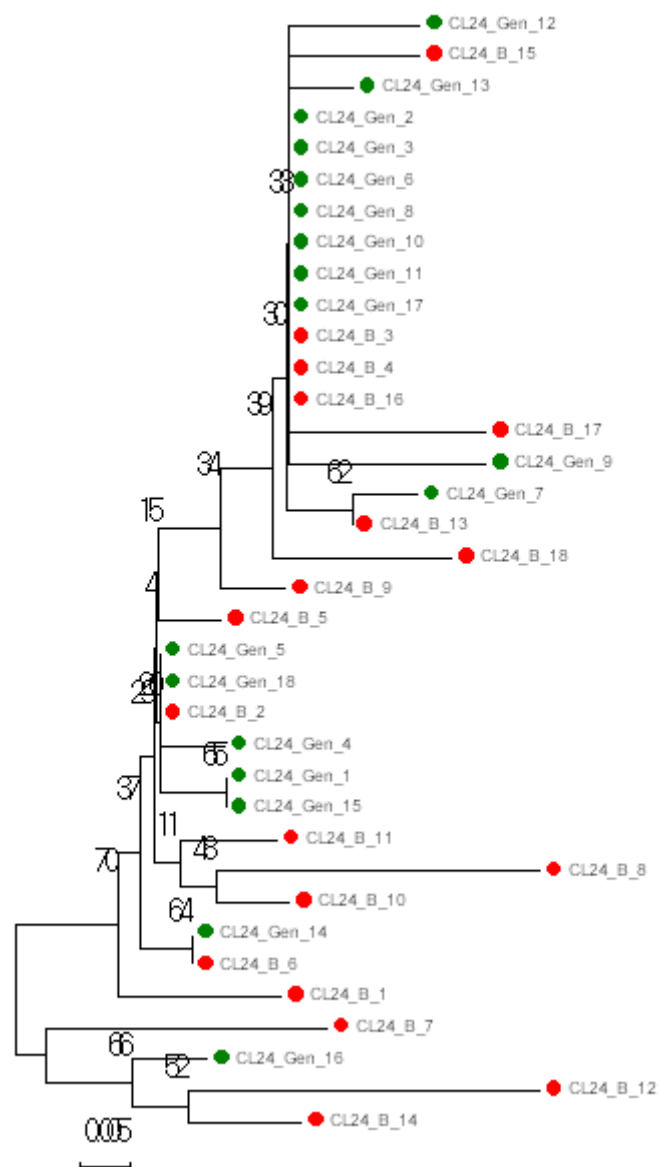
Observando as árvores de distância (Figuras 1-5) e relacionando com os resultados de polimorfismo de DNA, notamos que o CL24 (Figura 2) e CL76 (Figura 3) são os que possuem maior número e maior diversidade de haplótipos dentre os cinco analisados, resultando em uma distribuição mais homogênea entre sequências (Figuras 2, 3). Diferentemente, para CL1, CL204 e CL220, observamos grupos mais separados para as sequências de μ B-DNA e gDNA (Figuras 1, 4, 5). Curiosamente o CL204 (Figura 4) apresentou uma discrepância em relação ao padrão observado para as demais sequências, embora este seja o único DNAsat com menor número de sequências, possivelmente alterando este padrão observado, sendo necessário a recuperação de mais sequências para uma análise mais robusta.

Figura 1 - Árvore de distância CL1



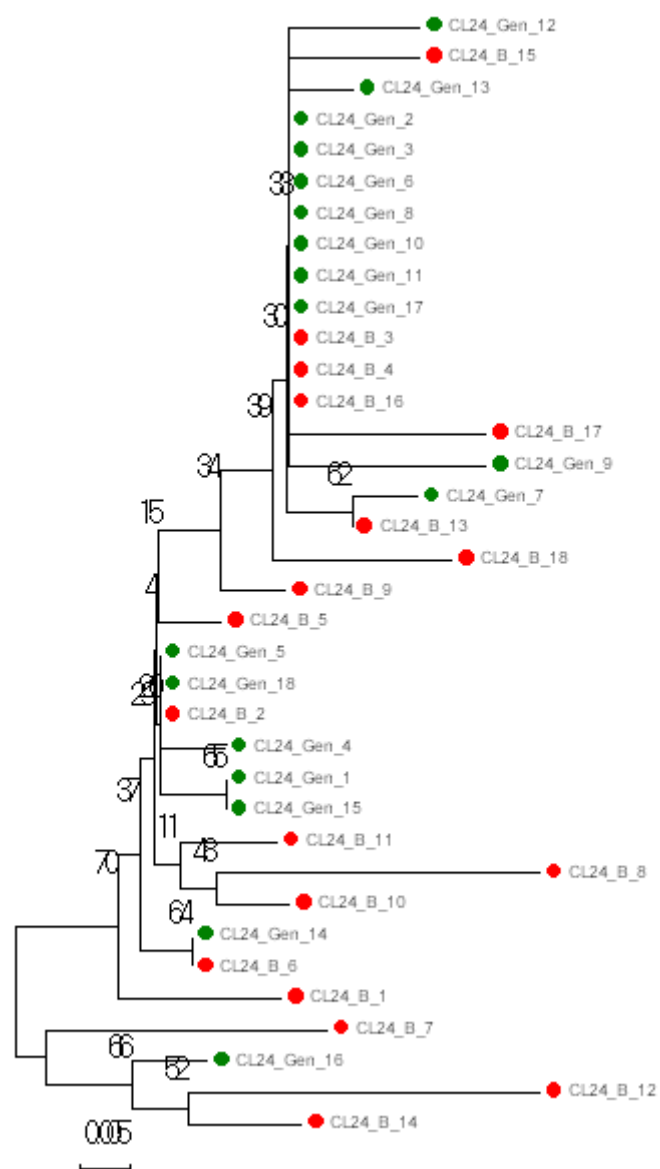
Fonte: Autoria própria. Análise da árvore de distância (Neighbor joining tree) do DNAsat CL1 obtida de sequências de gDNA-0B e DNA-μB da população de Rio Claro/SP. As cores verde e vermelho representam gDNA-0B e μB-DNA, respectivamente. Note a ocorrência de clados acentuadamente separados contendo sequências recuperadas do DNA-μB.

Figura 2 - Árvore de Distância CL24

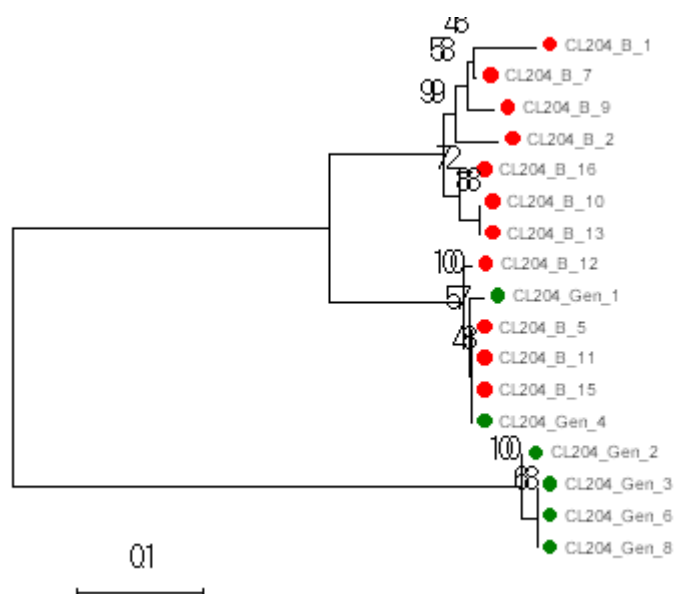


Fonte: Autoria própria. Análise da árvore de distância (Neighbor joining tree) do DNAsat CL24 obtida de sequências de gDNA-0B e DNA-μB da população de Rio Claro/SP. As cores verde e vermelho representam gDNA-0B e μB-DNA, respectivamente. Note que, apesar da ocorrência de clados separados contendo sequências recuperadas do DNA-μB, a divergência entre as sequências advindas dos diferentes cromossomos ainda não é tão marcante como na árvore anterior.

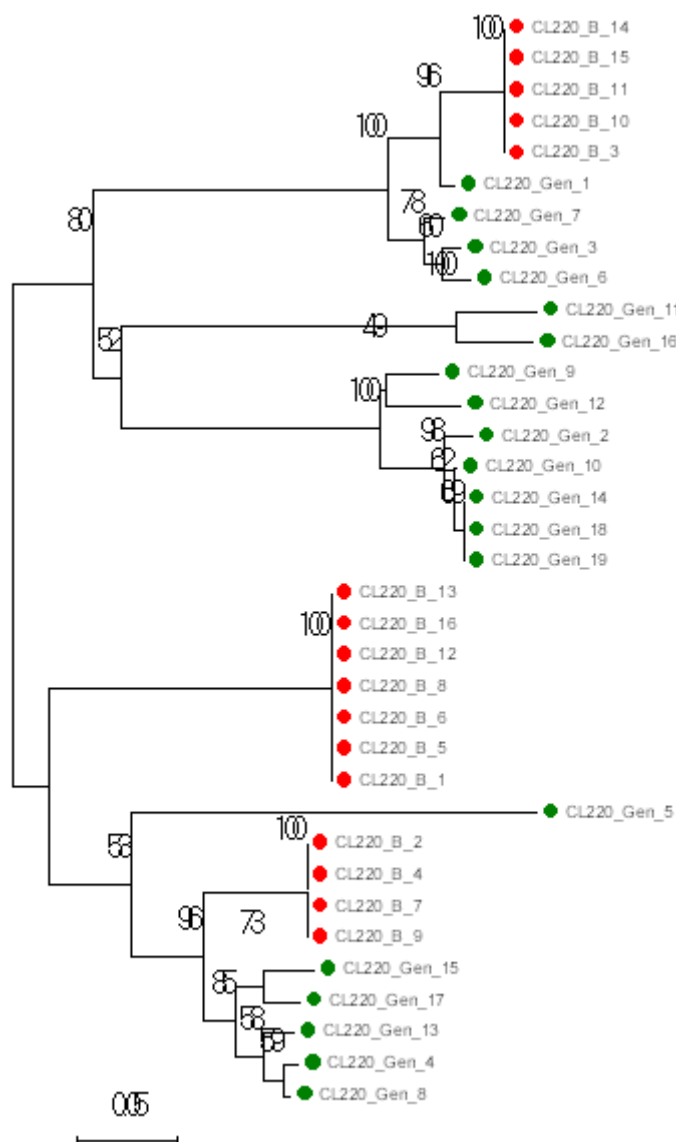
Figura 3 - Árvore de distância CL76



Fonte: Autoria própria. Análise da árvore de distância (Neighbor joining tree) do DNAsat CL24 obtida de sequências de gDNA-0B e DNA-μB da população de Rio Claro/SP. As cores verde e vermelho representam gDNA-0B e μB-DNA, respectivamente. Note que, apesar da ocorrência de clados separados contendo sequências recuperadas do DNA-μB, a divergência entre as sequências advindas dos diferentes cromossomos ainda não é tão marcante como na árvore anterior.

Figura 4 - Árvore de distância CL204

Fonte: Autoria própria. Análise da árvore de distância (Neighbor joining tree) do DNAsat CL204 obtida de sequências de gDNA-0B e DNA-μB da população de Rio Claro/SP. As cores verde e vermelho representam gDNA-0B e μB-DNA, respectivamente. Note que a quantidade de sequências obtidas é menor em relação às demais sequências, podendo ter acarretado a discrepância dessa árvore em vista das outras apresentadas. Assim mesmo, é possível observar que há uma separação acentuada entre as sequências do gDNA-0B e μB-DNA.

Figura 5 - Árvore de distância CL220

Fonte: Autoria própria. Análise da árvore de distância (Neighbor joining tree) do DNAsat CL220 obtida de sequências de gDNA-0B e DNA-μB da população de Rio Claro/SP. As cores verde e vermelho representam gDNA-0B e μB-DNA, respectivamente. Note que, apesar da ocorrência de clados separados contendo sequências recuperadas do DNA-μB, estas encontram-se mais agrupadas em relação ao CL1, CL24 e CL76 (Apêndices A, B e C, respectivamente), apresentando um divergência acentuada entre sequências do 0B e μB

5. Discussão

Sequências de DNAs satélites estão localizados majoritariamente na heterocromatina, o que faz com que esteja sujeito à diferentes processos e maiores taxas de mutações em relação aos genes encontrados na eucromatina, uma vez que a heterocromatina não é submetida à processos de

reparo tão rígidos (RUIZ-RUANO et al., 2016; MILANI et al., 2017; SUN et al., 2016; DIMITRI et al., 1997), sendo este um dos fatores que poderia justificar o alto número de mutações e sítios variáveis apresentados (Tabela 1). Além da localização cromossômica desses satélites, o fato do cromossomo B não sofrer recombinação com o complemento A, faz com que seja possível uma rápida acumulação de mutações em seu DNA, como observado neste estudo (HOUBEN et al., 2013; MARQUES et al., 2013). Ademais, apesar de os nossos resultados terem apresentado tal padrão apenas para os DNAsat CL24 e CL220 (Tabela 1), os cromossomos B têm sido reportados como mais tolerantes à eventos de mutação, uma vez que é um elemento acessório e dispensável ao genoma (RUBAN et al., 2014; MAKUNIN et al., 2014). O CL24 apresentou maior número de mutações e sítios variáveis para sequências provenientes do cromossomo B, o que, somado ao fato de que a diversidade nucleotídica e a quantidade e diversidade de haplótipos para esse satélite também fornecem tal padrão, pode-se sugerir que se trata de um DNAsat novo e com amplificação recente para esse cromossomo na espécie *A. flavolineata*, não tendo ainda sofrido o processo de homogeneização por tempo suficiente (UTSUNOMIA et al., 2017).

Em relação à porcentagem de G+C constatada, a maioria dos DNAsat apresentaram um menor conteúdo de G+C, comumente visto neste tipo de sequência repetitiva que indicam satélites de peso leve. No entanto, apesar do fato de CL24 aparecer mais abaixo da média dos demais, a média calculada no presente trabalho não foge ao relatado para a espécie (MILANI et al., 2017), embora seja um fator que apresente alguma variação (KOMISSAROV et al., 2011; STATOVIC; ZELJKO; PLOHL, 2018). Não por acaso, o CL24 apresenta baixa taxa de mutações, o que está relacionado, dentre outros fatores, com a porcentagem de G+C, pois já foi relatado que sequências ricas em G+C sofrem um aumento no número de mutações, uma vez que a desaminação da citosina é uma mutação que ocorre com alta frequência, sendo erroneamente reparada ou, por vezes, não sendo reparada (COULONDRE et al., 1978; COOPER et al., 2010; OSSOWSKI et al., 2009; PFEIFER, 2006). Esse padrão é muito nítido na tabela 1 para o cromossomo A, porém, para o cromossomo B, observa-se satélites que, mesmo tendo maior porcentagem de G+C, apresentaram menos

mutações do que o CL24. Contudo, essa inferioridade é muito baixa, e as mutações não se devem exclusivamente à este parâmetro, podendo então justificar essa diferença por outros mecanismos de mutabilidade que agem sobre o DNA.

É relevante ressaltar de que o CL204 apresentou uma discrepância em seus resultados em relação ao padrão observado para os demais. Esse é o único DNAsat com menor número de sequências recuperadas (aproximadamente metade do restante), o que, possivelmente, poderia influenciar nas análises relatadas (Tabela 1 e Figura 4) e como dito anteriormente é necessária a recuperação de mais sequências para análises mais robustas.

A quantidade e diversidade de haplótipos dos DNAsat (Tabela 1 e Figura 1-5), fornecem uma visão mais exata acerca do nível de conservação das sequências, o que proporciona uma análise evolutiva a respeito não só desses DNAsat, mas também a respeito do cromossomo B, uma vez que esse tem uma história evolutiva independente dos demais cromossomos do genoma (HUANG et al., 2016; MARTIS et al., 2012). Tendo em mente que os satélites tendem a seguir o padrão de evolução em concerto (LIAO, 1999; LIAO, 2008; HURST; SMITH, 1998; ELDER; TURNER, 1995), e analisando os dados de polimorfismo, nota-se que de modo geral, a quantidade e a diversidade de haplótipos obtidas foram grandes, especialmente para os DNAsat do cromossomo B. A quantidade de haplótipos foi alta, tendo atingido o máximo no satélite CL76, em que o número de haplótipos e de sequências recuperadas foram quase os mesmos para o μ B-DNA e os mesmos para 0B-gDNA, evidenciando alta diversidade entre as sequências. Essas constatações indicam que essas sequências ainda não tiveram tempo suficiente para atingir um estado de maior homogeneização, principalmente para aquelas recuperadas do μ B-DNA, ou que estão sofrendo maior taxa de mutação no cromossomo B. Tal fato pode se dar de duas maneiras principais: (1) as sequências podem ser relativamente novas para o cromossomo B, uma vez que a homogeneidade entre satélites depende da razão entre a taxa de mutação e a taxa de homogeneização/fixação no genoma, podendo esse processo demandar mais tempo em certas sequências ou organismos

(DOVER, 1986; UTSUNOMIA et al., 2017; UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002); (2) o cromossomo B pode ser um elemento evolutivamente novo no genoma de *A. flavolineata*, e, por isso, suas sequências de satélites, que também seriam evolutivamente novas, não tiveram tempo suficiente para a homogeneização (BUENO et al., 2013). A segunda possibilidade concorda o apresentado por Bueno et al. (2013), que sugere para uma origem recente desse cromossomo acessório na espécie *Abracris flavolineata* (BUENO et al., 2013). Estas possibilidades associadas à maior taxa de mutação no cromossomo B pode ser a causa da maior variabilidade.

Ainda em relação à quantidade e diversidade de haplótipos, observamos que os DNAsat CL24 e CL76 apresentaram os maiores números, e, em suas árvores de distância (Figuras 2, 3, respectivamente), pode-se observar que suas sequências apresentam maior proximidade entre aquelas advindas do cromossomo B e do complemento A, com certos agrupamentos contendo sequências de ambas origens, indicando menor diferenciação evolutiva entre cópias desses satélites nos diferentes genomas. Essa forma de distribuição não ocorre nas árvores de distância dos demais satélites, que apresentam uma divisão muito mais acentuada entre os grupos das sequências, o que indica um distanciamento evolutivo maior entre tais cópias do μ B e do complemento A.

De forma geral, os satélites aqui estudados apresentaram índice de diversidade nucleotídica relativamente alto, tanto para o cromossomo B quanto para o complemento A se comparado com o DNAsat AflaSAT-1 de *A. flavolineata* (MILANI et al., 2017) e, ainda mais se comparado com a diversidade nucleotídica de outros tipos de DNA repetitivos da espécie, como U2 snDNA (MENEZES-DE-CARVALHO et al., 2015). Como o gene U2 snDNA apresenta importantes funções biológicas para os indivíduos, evidentemente ele se mostra mais conservado em relação aos DNAsat, que nem sempre são transcritos e geralmente não apresentam funções essenciais para o desenvolvimento, sendo assim, alvos de maiores taxas de mutação.

Curiosamente, as próprias sequências de DNA repetitivos parecem exercer uma importante influência no processo de diferenciação do cromossomo B, sendo que um acúmulo desses elementos atua como bom artifício para uma rápida evolução dos Bs (CAMACHO et al., 2000; HOUBEN, 2017; MARTIS et al., 2012) e, portanto, levando suas sequências a se

divergirem de forma independente daquela do complemento A (JAMILENA et al., 1995; MARTIS et al., 2012). Essa independência evolutiva leva ao padrão revelado por meio da análise das árvores de distância (Figuras 1-5), nas quais observa-se que há uma nítida divergência entre sequências do 0B-gDNA e do μ B-DNA, sendo os casos mais evidentes para o CL1 (Figura 1), CL204 (Figura 4) e CL220 (Figura 5).

6. Conclusão

A análise de sequências de DNAsat, num comparativo entre cromossomos B e complemento A, revelou uma alta variabilidade para algumas sequências (CL1 e CL76). Os dados apresentados na tabela 1, juntamente com as árvores de distância, demonstram uma divergência evolutiva entre as sequências do genoma A e cromossomo B, indicando uma tendência ao aumento progressivo da diferenciação entre eles. A maior falta de homogeneização exibida pelos satélites CL24 e CL76 em relação aos demais, sugere que são mais recentemente amplificadas, do ponto de vista evolutivo, embora todas as sequências tenham apresentado uma variabilidade que sugerem o mesmo, ainda que algumas tenham apresentado variabilidade maior ou menor. Os dados apresentados juntamente com dados cromossômicos e de outras sequências de DNA em análise, somam para o entendimento dos padrões de origem e evolução do cromossomo B em *A. flavolineata*.

7. Referências

- ABAD, J. P. et al. Dodeca satellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 89, n. 10, p.4663-4667, 15 maio 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.10.4663>.
- ARTONI, Roberto Ferreira et al. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p.277-284, maio 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-005-4846-1>

BARTH, Adriane et al. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca latreille*, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Genetics And Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p.77-79, 19 nov. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572010005000100>.

BEUKEBOOM, Leo W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, v. 73, n. 3, p.328-336, set. 1994. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1994.140>.

BRITO, Rute; COSTA, Marco Antônio; POMPOLO, S. G. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal Of Genetics**, v. 20, n. 2, p.185-188, jul. 1997.

BUENO, D; PALACIOS-GIMENEZ, OM; CABRAL-DE-MELLO, DC. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **Plos One**, v. 8, n. 6, e66532, 27 jun. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066532>.

CABRAL-DE-MELLO, DC; MOURA, RC; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p.393-400, 16 set. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2009.126>

CABRERO, J. et al. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, v. 112, n. 4, p.207-211, 1 dez. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-003-0264-2>.

CABRERO, Josefa et al. Post-meiotic B chromosome expulsion, during spermiogenesis, in two grasshopper species. **Chromosoma**, v. 126, n. 5, p.633-644, 11 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-017-0627-8>.

CAMACHO, Juan Pedro M.; CARBALLO, Antonio R.; CABRERO, Josefa. The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). **Chromosoma**, v. 80, n. 2, p.163-176, set. 1980. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00286298>.

CAMACHO, Juan Pedro M.. B Chromosomes. **The Evolution Of The Genome**, p.223-286, 2005. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012301463-4/50006-1>.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W.. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1394, p.163-178, 29 fev. 2000. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2000.0556>.

CELLA, Maria D.; FERREIRA, A.. The cytogenetics of *Abracris flavolineata* (Orthoptera, Caelifera, Ommatolampinae, Abracrini). **Revista Brasileira de Genetica**, v. 14, n. 2, p.315-329, 1991.

CHARLESWORTH, Brian; SNIEGOWSKI, Paul; STEPHAN, Wolfgang. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p.215-220, set. 1994. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/371215a0>.

COOPER, David N et al. Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides. **Human Genomics**, v. 4, n. 6, p.406, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-7364-4-6-406>.

COULONDRE, Christine et al. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 274, n. 5673, p.775-780, ago. 1978. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/274775a0>.

DIMITRI, P. et al. High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 94, n. 15, p.8052-8057, 22 jul. 1997.

Proceedings of the National Academy of Sciences.

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.15.8052>.

DRUMMOND, A.J. et al.(2009). Geneious v4.8 [Internet]. Available from

<http://www.geneious.com>

DOVER, Gabriel A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends In Genetics**, v. 2, p.159-165, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(86\)90211-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(86)90211-8).

ELDER, John F.; TURNER, Bruce J. Concerted Evolution of Repetitive DNA Sequences in Eukaryotes. **The Quarterly Review Of Biology**, v. 70, n. 3, p.297-320, set. 1995. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/419073>.

FELICIELLO, Isidoro; AKRAP, Ivana; UGARKOVIĆ, Đurđica. Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress. **Plos Genetics**, v. 11, n. 8, e1005466, 14 ago. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005466>.

FLYNN, Jullien M et al. Rates and Patterns of Mutation in Tandem Repetitive DNA in Six Independent Lineages of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Genome Biology And Evolution**, v. 10, n. 7, p.1673-1686, 20 jun. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evy123>.

FRY, Kirk; SALSER, Winston. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**, v. 12, n. 4, p.1069-1084, dez. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90170-2](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(77)90170-2).

GANLEY, A. R.d.; KOBAYASHI, T.. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. **Genome Research**, v. 17, n. 2, p.184-191, 8 jan. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.5457707>.

GREEN, David M.. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, n. 6, p.818-824, dez. 1990. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/g90-123>.

HARPKE, Doerte; PETERSON, Angela. Non-concerted ITS evolution in Mammillaria (Cactaceae). **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 41, n. 3, p.579-593, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.036>.

HEWITT, G. M.; JOHN, B.. The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (thunb.). **Chromosoma**, v. 21, n. 2, p.140-162, 1967. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00343641>.

HOUBEN, Andreas. B Chromosomes – A Matter of Chromosome Drive. **Frontiers In Plant Science**, 15 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00210>.

HOUBEN, Andreas et al. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p.467-478, 3 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1437-7>.

HUANG, Wei et al. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). **Bmc Plant Biology**, v. 16, n. 1, p.1-1, 16 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0775-7>.

HURST, L. D.; SMITH, N. G. C.. The evolution of concerted evolution. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1391, p.121-127, 22 jan. 1998. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1998.0272>.

KAYANO, Hiroshi. Accumulation of B chromosomes in the germ line of *Locusta migratoria*. **Heredity**, v. 27, n. 1, p.119-123, ago. 1971. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1971.76>.

KELLER, I. et al. Ribosomal DNA in the Grasshopper *Podisma pedestris*: Escape From Concerted Evolution. **Genetics**, v. 174, n. 2, p.863-874, 1 set.

2006. Genetics Society of America.

<http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.061341>

KOMISSAROV, Aleksey S et al. Tandemly repeated DNA families in the mouse genome. **Bmc Genomics**, v. 12, n. 1, p.2222-2222, 28 out. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-531>.

KUHN, G C S. 'Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*'. **Heredity**, v. 115, n. 1, p.1-2, 25 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2015.12>.

LAHERRÁN, Roberto de et al. Slow Rates of Evolution and Sequence Homogenization in an Ancient Satellite DNA Family of Sturgeons. **Molecular Biology And Evolution**, v. 18, n. 3, p.432-436, 1 mar. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003820>.

LIAO, Daiqing. Concerted Evolution. **Encyclopedia Of Life Sciences**, 14 mar. 2008. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0005132.pub2>.

LIAO, D. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. **The American Journal Of Human Genetics**, v. 64, n. 1, p.24-30, jan. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/302221>

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

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Achiasmate segregation of X and B univalents in males of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* is independent of previous association. **Chromosome Research**, v. 4, n. 1, p.43-48, jan. 1996. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02254944>.

MAKUNIN, Alexey I et al. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p.222-222, dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-014-0099-y>.

MARQUES, A. et al. B chromosomes of rye are highly conserved and accompanied the development of early agriculture. **Annals Of Botany**, v. 112, n. 3, p.527-534, 5 jun. 2013. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mct121>.

MARTIS, M. M. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 33, p.13343-13346, 30 jul. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1204237109>.

MENDELSON, Dan; ZOHARY, Daniel. Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. **Heredity**, v. 29, n. 3, p.329-339, dez. 1972. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1972.97>

MENEZES-DE-CARVALHO, N. Z. et al. High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Molecular Genetics And Genomics**, v. 290, n. 5, p.1787-1792, 7 abr. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-015-1033-7>.

MILANI, Diogo; CABRAL-DE-MELLO, Diogo Cavalcanti. Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping. **Plos One**, v. 9, n. 5, e97956, 28 maio 2014. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097956>.

MILANI, Diogo et al. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Bmc Genetics**, v. 18, n. 1, p.55-55, 29 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-017-0548-9>.

NOVAK, P. et al.(2013) – RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. **Bioinformatics** 29: 792-793.

NUR, Uzi. Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. **Chromosoma**, v. 27, n. 1, p.1-19, 1969. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00326108>.

OHNO, S. So much 'junk' in our genomes. **Brookhaven Symp Biol.**, v. 23, p.366-370, 1972.

OHTA, Shoji. Mechanisms of B-chromosome accumulation in *Aegilops mutica* Boiss. **Genes & Genetic Systems**, v. 71, n. 1, p.23-29, 1996. Genetics Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1266/ggs.71.23>.

OLIVEIRA, Sarah Gomes de; MOURA, Rita Cassia de; MARTINS, Cesar. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. **Bmc Genetics**, v. 13, n. 1, p.96, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-13-96>.

ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**, v. 284, p. 604–607.

OSSOWSKI, S. et al. The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 327, n. 5961, p.92-94, 31 dez. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1180677>.

PALACIOS-GIMENEZ, Octavio M.; BUENO, Danilo; CABRAL-DE-MELLO, Diogo C.. Chromosomal mapping of two Mariner-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) reveals enrichment in euchromatin. **European Journal Of Entomology**, v. 111, n. 3, p.329-334, 14 jul. 2014. Biology Centre, AS CR. <http://dx.doi.org/10.14411/eje.2014.052>.

PALESTIS, Brian G. et al. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. **Genetica**, v. 138, n. 11-12, p.1181-1189, 31 out. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-010-9509-1>.

PALOMEQUE, T; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p.564-573, 16 abr. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2008.24>.

PEZER, M. et al. Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation. **Genome Dynamics**, p.153-169, 2012. S. KARGER AG.
<http://dx.doi.org/10.1159/000337116>.

PFEIFER, G. P.. Mutagenesis at Methylated CpG Sequences. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, p.259-281, 2006. Springer-Verlag.
http://dx.doi.org/10.1007/3-540-31390-7_10.

PIDOUX, A. L.; ALLSHIRE, R. C.. The role of heterochromatin in centromere function. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1455, p.569-579, 29 mar. 2005. The Royal Society.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2004.1611>.

ROBLES, Francisca et al. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. **Gene**, v. 338, n. 1, p.133-142, ago. 2004. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.001>.

ROSS, Ralf; HANKELN, Thomas; SCHMIDT, Erwin R.. Complex Evolution of Tandem-Repetitive DNA in the *Chironomus thummi* Species Group. **Journal Of Molecular Evolution**, v. 44, n. 3, p.321-326, mar. 1997. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1007/pl00006149>.

RUBAN, Alevtina et al. B Chromosomes of *Aegilops speltoides* Are Enriched in Organelle Genome-Derived Sequences. **Plos One**, v. 9, n. 2, 26 fev. 2014. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090214>.

RUBAN, Alevtina et al. How Next-Generation Sequencing Has Aided Our Understanding of the Sequence Composition and Origin of B Chromosomes. **Genes**, v. 8, n. 11, p.294, 25 out. 2017. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/genes8110294>.

RUIZ-RUANO, Francisco J. et al. Quantitative sequence characterization for repetitive DNA content in the supernumerary chromosome of the migratory

locust. **Chromosoma**, v. 127, n. 1, p.45-57, 4 set. 2017. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00412-017-0644-7>.

RUIZ-RUANO, Francisco J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 7 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28333>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratorial manual. 3rd. Vol. 18, p. 2100. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. <https://doi.org/10.1002/humu.1186.abs>

SLAMOVITS, Claudio H. et al. Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae). **Molecular Biology And Evolution**, v. 18, n. 9, p.1708-1719, 1 set. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003959>.

STATOVIĆ, E.; ZELJKO, T. Vojvoda; PLOHL, M.. Characteristics and evolution of satellite DNA sequences in bivalve mollusks. **The European Zoological Journal**, v. 85, n. 1, p.95-104, jan. 2018. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/24750263.2018.1443164>.

SUN, Lue et al. Preferential Protection of Genetic Fidelity within Open Chromatin by the Mismatch Repair Machinery. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 291, n. 34, p.17692-17705, 5 jul. 2016. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m116.719971>

UGARKOVIĆ, Durdica. Functional elements residing within satellite DNAs. **Embo Reports**, v. 6, n. 11, p.1035-1039, nov. 2005. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400558>.

UGARKOVIĆ, Durdica; DURAJLIJA, Sonja; PLOHL, Miroslav. Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. **Journal Of Molecular Evolution**, v. 42, n. 3, p.350-358, mar. 1996. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02337545>.

UGARKOVIĆ, Đurđica; PLOHL, Miroslav. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. **The Embo Journal**, v. 21, n. 22, p.5955-5959, 15 nov. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf612>.

UTSUNOMIA, Ricardo et al. A Glimpse into the Satellite DNA Library in Characidae Fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers In Genetics**, v. 8, 14 ago. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2017.00103>

VICARI, Marcelo Ricardo et al. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, v. 139, n. 8, p.1073-1081, ago. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-011-9611-z>.

ZHENG, Xiaoyan et al. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 48, n. 3, p.892-903, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.039>.