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

**DNAS SATÉLITES E EVOLUÇÃO DO SISTEMA SEXUAL
NEO-XY DO GAFANHOTO *RONDEROSIA BERGII*:
UMA ABORDAGEM CITOGENÔMICA**

Ana Beatriz Stein Machado Ferretti

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

Janeiro - 2020

ANA BEATRIZ STEIN MACHADO FERRETTI

DNAS SATÉLITES E EVOLUÇÃO DO SISTEMA SEXUAL NEO-XY DO
GAFANHOTO *RONDEROSIA BERGII*: UMA ABORDAGEM CITOGENÔMICA

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

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 e Molecular).

Rio Claro
2020

F387d

Ferretti, Ana Beatriz Stein Machado

DNAs satélites e evolução do sistema sexual neo-XY do gafanhoto
Ronderosia bergii: uma abordagem citogenômica / Ana Beatriz Stein
Machado Ferretti. -- Rio Claro, 2020

61 f. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello

1. Variação intrapopulacional. 2. DNA satélite. 3. Elementos de
Transposição. 4. Orthoptera. 5. Neo-Y. 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: DNAs satélites e evolução do sistema sexual neo-XY do gafanhoto
Ronderosia bergii: uma abordagem citogenômica**

AUTORA: ANA BEATRIZ STEIN MACHADO FERRETTI

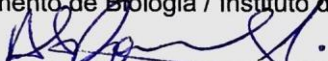
ORIENTADOR: DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO

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



Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro-SP



Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES

Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro-SP



Prof. Dr. CESAR MARTINS

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu-SP

Rio Claro, 17 de fevereiro de 2020

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que contribuíram de alguma maneira durante o período de mestrado.

Agradeço primeiramente a minha família por sempre me apoiarem e encorajarem, e principalmente, quando eu disse que queria seguir carreira de pesquisadora, eles logo disseram que era a minha cara, já que desde pequena sempre tentei entender e descobrir as razões e os porquês de tudo. Muito obrigada pelo apoio em todo os momentos da minha vida, e também pelos puxões de orelha quando necessários.

Um outro grande agradecimento vai para meu orientador Professor Diogo Cavalcanti Cabral de Mello, pelo incentivo e confiança em meu trabalho, sempre se mostrando disposto a ajudar na resolução de problemas e também sempre disposto a ouvir sugestões e fazer discussões que permitem que o grupo tenha uma atmosfera estimulante, que nos ajuda a melhorar e nos desenvolver como pesquisadores.

Agradeço também aos Professores e integrantes do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, e em especial à professora Patrícia Pasquali Parise Maltempi e seu grupo, pela amizade e por todo o convívio diário de modo leve e animador.

A todos os amigos do Insect Citogenomics Group, pelos ensinamentos, conquistas, comemorações, conversas, risadas e que sempre me auxiliaram no desenvolvimento de novos experimentos e conhecimento. Vavá, Milani, Ana Elisa, Emiliano e Lucas, muito obrigada! E aos nossos agregados Gerson, Tati, Luiza, Roque obrigada por toda amizade e incentivo durante essa etapa.

Agradeço também aos meus amigos de infância, aos da faculdade e aos que conheci em algum lugar desse mundo, que podem não estar perto no dia a dia, mas foram muito importantes em etapas da minha vida e sempre estarão comigo! Em especial Lúcia, Heloiza, Ariane, Oriana, Laila, Augusto, Camilla, Maria Helena, Bárbara, Letícia, Luan, Vítor, Victória. Obrigada queridos!

Por fim, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UNESP de Rio Claro/SP. Agradeço à A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro às pesquisas do laboratório (processo número: 15/16661-1). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan

RESUMO

Uma característica comum da evolução dos cromossomos sexuais é a acumulação de DNAs repetitivos, que estão envolvidos em sua diversificação e degeneração. Em gafanhotos o sistema ancestral dos cromossomos sexuais é o XO, mas em algumas espécies os cromossomos sexuais neo-XY surgiram por translocação Robertsonian entre o X ancestral e um par autossômico. Esse é o caso do *Ronderosia bergii* (Acrididae: Melanoplinae) que adicionalmente também apresentou uma grande inversão pericêntrica no neo-Y, fazendo com que essa seja uma espécie singular para o entendimento da evolução dos cromossomos sexuais. Nesse estudo foi caracterizado os DNA satélites e Elementos de Transposição da espécie, com enfoque no entendimento das diferenças entre macho e fêmea e que estão putativamente associados aos cromossomos sexuais. Foi encontrado um total de 54 famílias de DNAs satélites e 56 famílias de TEs. Os DNAsat foram 13,5% mais abundantes no genoma do macho, enquanto os TEs foram apenas 1,02% mais abundantes no genoma da fêmea, evidenciando alta amplificação dos DNAsat no cromossomo neo-Y e menor envolvimento dos TEs na diferenciação dos cromossomos sexuais. A alta diferenciação entre os cromossomos sexuais é observada pela amplificação de múltiplos DNAsat no neo-Y com ocorrência de famílias exclusivamente mapeadas nesse cromossomo, entretanto, algum grau de homologia foi observado. Os dados do mapeamento dos DNAsat evidenciou um alto *turnover* dos neo-cromossomos sexuais em *R.bergii* em nível intrapopulacional, causados por múltiplas inversões paracêntricas e outros rearranjos como amplificações e transposições. Finalmente, a espécie é um exemplo experimental de como após a supressão da recombinação, os DNAs repetitivos podem estar envolvidos na geração de variabilidade dos cromossomos sexuais e é um modelo útil no entendimento da evolução dos cromossomos sexuais em nível intrapopulacional.

Palavas-chave: Elementos de transposição, DNA satélite, variação intrapopulacional, neo-Y, orthoptera

ABSTRACT

A common characteristic along sex chromosome evolution is the accumulation of repetitive DNAs, which could account for their diversification and degeneration. In grasshoppers the ancestral sex chromosome system is XO, but in some species neo-XY sex chromosome emerged by Robertsonian translocation with an autosomal pair. This is the case of the Melanoplinae *Ronderosia bergii* that additionally present a large pericentric inversion in the neo-Y, making this a singular species to understand evolution of sex chromosomes. Here we characterized the satellite DNAs and Transposable Elements of the species focused in the understanding of differences between male and female genomes that are putatively associated with sex chromosomes. We found a total of 54 satDNA families and 56 families of TEs. The satDNAs were 13.5% more abundant in male genomes, while TEs were only about 1.02% more abundant in female genome, evidencing high amplification of satDNAs on neo-Y chromosome and minor role of TEs in sex chromosome differentiation. The high differentiation between the sex chromosomes is demonstrated by amplification of multiply satDNAs in neo-Y and occurrence of families exclusively mapped on this chromosome, although some degree of homology was noticed. Our data of chromosomal mapping of satDNAs evidenced high turnover of neo-sex chromosomes in *R. bergii* at intrapopulation level, caused by multiply paracentric inversions and other rearrangements like amplifications and transpositions. Finally the species is an experimental example of the action of repetitive DNAs after the suppression of recombination in the generation of variability for sex chromosomes and is a helpful model to understand sex chromosome evolution at intrapopulation level.

Key-words: satellite DNA, transposable elements, neo-Y, intrapopulation variation, orthoptera

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1-Origem e evolução dos cromossomos sexuais	7
1.2-Cromossomos sexuais em gafanhotos	8
1.3-Estrutura e evolução de DNAsat e Elementos de Transposição	9
1.3.1-DNA satélites	9
1.3.2-Elementos transponíveis	12
1.8- <i>Ronderosia bergii</i> como modelo para estudo dos neo-cromossomos sexuais	13
2.OBJETIVOS	14
2.1-Objetivos gerais	14
2.2-Objetivos específicos	14
3.MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1-Material Biológico.e obtenção de cromossomos	15
3.2-Sequenciamento	15
3.3-Análise de sequências repetitivas	15
3.3.1-Análise dos DNA satélites	16
3.3.2-Análise dos Elementos transponíveis	16
3.4-Amplificação dos DNAs repetitivos por PCR	17
3.5-Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	18
3.5-Desenho experimental para localização de DNAsats e variabilidade dos neo-cromossomos sexuais	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1-Manuscrito: <i>The high dynamism for neo-sex chromosomes is mediated by multiples chromosomal rearrangements and repetitive DNAs in the grasshopper Ronderosia bergii</i>	20
5. CONCLUSÕES GERAIS	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e evolução dos cromossomos sexuais

O mais simples dos mecanismos heterogaméticos de determinação sexual baseado em cromossomos tem uma consistente diferença genética entre machos (XY heterogaméticos) e fêmeas (XX homogaméticas), ou ainda podendo ter a notação ZZ/ZW, onde a fêmea é a heterogamética (BULL, 1985). O sistema heterogamético de determinação sexual ocorre nas diversas classes de vertebrados (principalmente em aves e mamíferos) e em diversos invertebrados, como insetos, nematóides e aracnídeos. Alguns grupos podem ser heterogaméticos para machos ou fêmeas (ex. peixes, anfíbios e lagartos), somente para os machos (ex. mamíferos, aracnídeos, gafanhotos e nematóides) ou somente para as fêmeas (aves, cobras e lepidópteros) (WHITE, 1973; BULL, 1983; SCHMID, 1983; TRAUT et al., 2007; BACHTROG et al., 2014; WRIGHT et al., 2017).

A história evolutiva de organismos dióicos ainda não é totalmente conhecida e envolve várias etapas: sabe-se que ocorreu a diferenciação de gametas em masculinos e femininos; a separação dos sexos em machos e fêmeas (em oposição aos hermafroditas); e finalmente a evolução dos sistemas de determinação sexual que pode ser baseado em cromossomos, levando a um cromossomo Y ou W com pouca quantidade de informação genética (CHARLESWORTH, 1989; CHARLESWORTH 2017; BLACKMON e DEMUTH, 2015; DAISH e GRÜTZER, 2019). Os cromossomos sexuais (X e Y ou Z e W) são originados de um par de cromossomos autossômicos morfologicamente idênticos e evoluíram independentemente repetidamente em uma ampla variedade de animais e plantas (OHNO, 1967; BULL, 1983, CHARLESWORTH et al., 2005; BACHTROG 2013). Apesar dessa evolução independente, os cromossomos sexuais apresentam algumas características convergentes entre diversos grupos. Primeiramente, a aquisição de um gene de determinação sexual que é o fator de início da evolução dos cromossomos sexuais. O cromossomo Y ou W apresenta uma subsequente supressão de recombinação com seu homólogo (X ou Z), que proporciona o acúmulo de diferenças na composição molecular, que envolve genes e DNAs repetitivos. A seleção de alelos que são benéficos para um dos sexos e desvantajosos para o outro, além do acúmulo diferencial de DNAs repetitivos ocasiona a divergência morfológica e genética. Uma vez que o cromossomo Y ou W para de se recombinar, torna-se clonal no genoma e é iniciado o processo de degeneração gênica, levando à perda ou supressão de diversos genes ligados a eles. Rearranjos cromossômicos (inversões, translocações e fusões) são documentados e aceleram o processo de degeneração e heterocromatinização por acúmulo de DNAs repetitivos. Enquanto que o cromossomo X ou Z continua a se recombinar nas

fêmeas ou nos machos, respectivamente, e com isso, os genes ligados a esse cromossomo persistem gerando variabilidade por recombinação ao longo das gerações (ELLEGREN, 2011; BACHTROG, 2011, 2013; WRIGHT et al., 2016; CHARLESWORTH, 2017).

Após o estabelecimento dos cromossomos sexuais, são documentados alguns casos da total perda do elemento heteromórfico (Y ou W), levando ao surgimento de sistemas de determinação sexual XO ou ZO como em alguns insetos e vermes (BLACKMON e DEMUTH 2014; 2015b; DAISH e GRÜTZNER, 2019). Além disso, cromossomos sexuais que estão estabelecidos, podem sofrer fusões ou translocações com autossomos, resultando em cromossomos sexuais recentes, como simples neo-XY ou neo-ZW ou ainda, sistemas múltiplos (CHARLESWORTH et al., 2005; VELTSOS et al., 2008). Curiosamente, a origem de neo-cromossomos sexuais pode resultar no ganho de um novo Y ou W em algumas espécies que os perderam ancestralmente, como documentado na transição de ZO para neo-ZW em lepidópteros ou de XO para neo-XY em ortópteros (TRAUT et al., 2007, MAREC et al., 2010; CASTILLO, 2010; BIDAU e MARTI, 2001; BLACKMON et al., 2017). Essas espécies seriam ótimos modelos experimentais para o estudo de processos envolvidos na degeneração do cromossomo Y ou W, devido a evidências de que os neo-cromossomos sexuais sofrem os mesmos processos evolutivos (supressão de recombinação, acúmulo de DNA repetitivo, perda de genes e múltiplos rearranjos) e podem apresentar estágios de evolução menos avançados, devido, a fusões mais recentes (CHARLESWORTH et al., 2005; VELTSOS et al., 2008; CASTILLO et al., 2010).

1.2. Cromossomos sexuais em gafanhotos

O cariótipo dos ortópteros apresenta variações e rearranjos nos diferentes grupos, incluindo gafanhotos, grilos e esperanças (WHITE, 1973; HEWITT, 1979, WARCHALOWSKA-ŚLIWA, 1998; FERREIRA, 2010; ZEFA, 1999; FERREIRA ET AL 2006). Mesmo com essa variação cariotípica, o sistema sexual XO^{σ}/XX^{φ} é bastante conservado em ortópteros e provavelmente evoluiu do sistema XY^{σ}/XX^{φ} (WHITE 1941; HUGHES-SCHRADER 1947; HEWITT 1979) pela perda do cromossomo Y. Entre os gafanhotos o número cromossômico mais frequente é o $2n=23^{\sigma}/24^{\varphi}$ com sistema sexual do tipo XX^{σ}/XO^{φ} , porém, alguns outros sistemas sexuais derivados também são encontrados, como por exemplo o neo- XY^{σ}/XX^{φ} e os sistemas múltiplos neo- $X_1X_2Y^{\sigma}/X_1X_1X_2X_2^{\varphi}$. A subfamília Melanoplinae, que faz parte da família Acrididae, além de ter algumas espécies com rearranjos cariotípicos envolvendo autossomos, apresenta também um grande número de espécies com neo-sistemas cromossômicos sexuais (BIDAU E MARTÍ, 2001; CASTILLO, et

al 2010; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2015a).

As causas da origem de neo-cromossomos sexuais em Orthoptera tem sido atribuída à múltiplos eventos de rearranjos cromossômicos, como por exemplo fusões Roberstsonianas, translocações recíprocas, fissões e inversões envolvendo autossomos e cromossomos sexuais, e também e em algumas espécies foram descritas inversões e supressão da recombinação, como por exemplo em *Ronderosia bergii* (WHITE, 1973; MESA et al., 2001; CASTILLO et al., 2010; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013; 2015a;b).

Quanto a composição específica dos neo-cromossomos sexuais em Orthoptera, o conhecimento é bastante restrito. Foi documentada a presença de DNAs ribossômicos, incluindo o 18S e 5S, genes de DNAsn U2 e U1, genes de histona, além de diversos DNAs satélites no grilo *E. surinamensis* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013;2015; CASTILLO et al., 2016; JETYBAYEV et al., 2017). Esses trabalhos representam um início do conhecimento sobre os neo cromossomos sexuais, uma vez que com a avanço das tecnologias já é possível realizar estudos mais aprofundados das variadas sequências encontradas nos cromossomos.

1.3. Estrutura e evolução de DNAsat e Elementos de Transposição

O avanço de análises genômicas a partir de dados de sequenciamento permitiram maior avanço e entendimento da biologia e padrões de origem e evolução de DNAs repetitivos nos genomas. Além disso, a prospecção de DNAs repetitivos por ferramentas bioinformáticas tem permitido grande avanço em estudos de evolução cariotípica.

1.3.1. DNAs satélites

Os DNAsat são os principais componentes da heterocromatina e consistem em uma mesma sequência repetida diversas vezes ao contrário dos genes repetidos em tandem que apresentam uma alta diversidade de sequências (como genes e espaçadores). Os DNAsat surgem e são fixados em diferentes famílias a partir de mecanismos de mutação seguidos de evolução em concerto, que envolve homogeneização dos monômeros. Estas sequências podem apresentar ampla variabilidade nos genomas quanto ao número de famílias, na estrutura e na quantidade de repetições, podendo variar entre mil e cem mil cópias em uma unidade de repetição, com tamanho de monômero geralmente entre 100-300pb (JOHN e MIKLOS, 1979; CHARLESWORTH et al.,1994; UGARKOVIC e PLOHL, 2002; PALOMEQUE e LORITE, 2008; PLOHL et al., 2008). Além de encontradas clusterizadas em regiões como centrômeros e telômeros, os DNAsat são importantes componentes dos cromossomos sexuais, como documentado em planta (*Rumex acetosa*), platelminto

(*Schistosoma mansoni*), grilo (*Eneoptera surinamensis*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), dentre outros (BROSSEAU, 1960; CHARLESWORTH et al., 1994; MARIOTTI et al., 2008; LEPESANT et al., 2012; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017a; KHOST et al., 2017). Além disso, diversos DNAsat na eucromatina foram documentados em diversos insetos (BRAJKOVIĆ et al. 2012; LARRACUENTE et al., 2014; PAVLEK et al., 2015; RUIZ-RUANO et al., 2016; SILVA et al., 2019; , SPROUL et al. 2019;

Recentemente tem sido descobertas funções para os DNAs satélites através de verificação de sua transcrição. O besouro *Tribolium castaneum* após *stress* por altas temperaturas apresenta um aumento no satélite TCAST1 tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas, acarretando na supressão dos genes que estão próximos (FELICIELLO et al., 2015). Também foi mostrada a associação dos DNAsat em modificações epigenéticas da cromatina para a formação do centrômero e manutenção da heterocromatina através de RNA de interferência (RNAi) ou pequenos RNAs de interferência (siRNA) em espécies de levedura (*Schizosaccharomyces pombe*), arroz (*Oryza sativa* spp. *Japônica*) e díptero (*Drosophila melanogaster*) (VOLPE et al., 2002; PALBHADRA et al., 2004; LEE et al., 2006; USAKIN et al., 2007; GREWAL e ELGIN 2007). Nos grilos do gênero *Gryllus* foi encontrada transcrição diferencial de sete DNAsat entre quatro espécies (*G.assimilis*, *G.bimaculatus*, *G.rubens* e *G.firmus*), apresentando quantidades diferentes de RNA nos diversos tecidos analisados, sugerindo importância na organização e regulação dos genomas, tanto sendo responsáveis por modificações epigenéticas na cromatina quanto afetando a expressão de genes (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017b)

Diversos DNAsat foram descobertos por restrição enzimática e eletroforese, porém essa técnica tem mostrado limitações. Para a realização dessa técnica era necessário o uso de diversas enzimas de restrição para a fragmentar o DNA e ocasionalmente encontrar um padrão característico de DNAsat que revela um padrão ladder (*ladder pattern*) no gel de agarose após a eletroforese. Após isso, os monômeros encontrados são clonados e isolados por PCR para as subsequentes análises. Contudo, vários obstáculos existem nessa técnica, como por exemplo dificuldade em encontrar DNAsat que estão em pequena proporção no genoma, dificultando muito a quantificação das famílias presentes uma vez que podem escapar da identificação por enzima de restrição. O surgimento e diminuição no custo do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) que pode sequenciar grande quantidade de sequências de DNA e a aplicação de ferramentas de bioinformática como o RepeatExplorer tem permitido um avanço significativo do entendimento dos DNAsat em genomas de espécies não modelo. Essa ferramenta agrupa as sequências similares e existentes em altas quantidades

em *clusters*, possibilitando a identificação das sequências repetitivas (NOVÁK et al. 2013; RUIZ-RUANO et al., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017). Ruiz-Ruano e colaboradores (2016) desenvolveram um *pipeline* nomeado SatMiner que permite a identificação de famílias de DNAsat que são menos abundantes no genoma, possibilitando que a coleção completa (ou próximo disso) de DNAsat seja encontrada. Essa coleção foi nomeada de “satelitoma” pelos autores e tem esclarecido vários aspectos da evolução dos DNAsat. Usando essa *pipeline* os autores verificaram a existências 62 famílias de DNAsat no genoma de *Locusta migratoria* enquanto que as técnicas clássicas não haviam detectado nenhum DNAsat (RUIZ-RUANO et al., 2016).

A exemplo do uso do RepeatExplorer ou seu uso aliado a outras ferramentas (SatMiner), temos estudos em diversos grupos mostrando essas sequências podem ser úteis para o estudo do entendimento da própria evolução das sequencias, de um modo mais geral, assim como para o estudo entre populações e espécies e ainda, para o entendimento de alguns cromossomos específicos, como no caso do cromossomo supranumerário (B) ou cromossomos sexuais. Em plantas, os DNAsat foram usados para o entendimento do cromossomo holocinéticos (HECKMANN et al. 2013) logo que o RepeatExplorer foi desenvolvido e também mais recentemente para o estudo de variações entre populações (RUIZ-RUANO et al. 2019). Em peixes, essas sequências repetitivas foram usadas para o entendimento da diferenciação dos cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al. 2019) e de cromossomos supranumerários (B) (SERRANO-FREITAS et al. 2019), e também para realizar o estudo de homologias de famílias de DNAsat entre espécies (SILVA et al., 2017). Outro exemplo é em *Drosophila* cactofilicas e em *D. virilis* e *D. americana* onde satélites mais abundantes foram recuperados e estudado sua homologia, abundância e distribuição cromossômica (Lima et al. 2017; Silva et al. 2019). Em Hemiptera o genoma de *Triatoma infestans* foi estudado, sendo útil para entendimento da dinâmica das famílias de DNAsat em populações Andina e não Andina (Pita et al. 2017). Para gafanhotos, os DNAsat tem sido usados para estudar de modo geral a evolução dos genomas e dessas sequências (RUIZ-RUANO et al., 2016; 2018a), assim como sua expressão e função (PALACIOS-GIMENEZ et al. 2017,a), e também para o entendimento de mecanismos de evolução relacionados a cromossomos específicos, como no caso dos cromossomos B (RUIZ-RUANO et al., 2017; 2018,b; MILANI et al. 2017;) e cromossomos sexuais (PALACIOS-GIMENEZ et al. 2017,b; 2018).

1.3. Elementos transponíveis (TEs)

Na maior parte dos eucariotos, os TEs podem compreender uma grande parte do genoma, com sequências de até milhares de pares de bases em tamanho e os números de cópias podem variar de algumas a centenas de milhares de inserções, o que contribui significativamente para o tamanho genômico e sua evolução, podendo chegar até 85% do genoma como é o exemplo do milho (SCHNABLE et al., 2009, WICKER et al., 2007, BIÉMONT e VIEIRA, 2006). A composição dos TEs varia bastante intra e interespecificamente, e também, a ampla variação de abundância entre populações, pode indicar invasão recente dessas sequências, podendo até conduzir à especiação (SERRATO-CAPUCHINA e MATUTE, 2018). Uma das capacidades mais notáveis dos TEs é sua capacidade de movimentação dentro dos genomas, podendo se inserir em genes ou regiões reguladoras e também, causar recombinação ectópica em razão da sua natureza repetitiva. Um exemplo notável da ação dos transposons foi genoma do arroz, onde um único grupo (MULEs - Mutator-like elements) foram responsáveis pela captura e reposicionamento de aproximadamente 1.000 fragmentos de genes (JIANG et al., 2004, GOODIER e KAZAZIAN 2008; BECK et al., 2011; VELA et al., 2014). Por esse motivo os TEs foram por muito tempo considerados como parasitas dos genomas, mas hoje, acredita-se que são importantes mediadores de adaptações biológicas, podendo assim, influenciar trajetórias evolutivas de diferentes espécies (WICKER et al., 2007; ARKHIPOVA, 2017; BOURQUE et al., 2018). Devido a essas características, os TEs são considerados uma força que pode dirigir a evolução dos cromossomos sexuais, visto seu grande acúmulo nesses, como por exemplo nas espécies *Drosophila miranda* (CARVALHO, 2002; BACHTROG, 2005), *Apareiodon* sp (SCHEMBERGER et al., 2019) e *Silene latifolia* (MATSUNAGA, 2009; KEJNOVSKY et al., 2013).

Existe em uma variedade muito grande de TEs em relação a sua estrutura e composição. Devido a isso, estes elementos podem ser subdivididos em várias classes e famílias. A primeira divisão é em classe, a classe I é formada pelos retotransposons e a classe II pelos transposons de DNA. A primeira tem um mecanismo de “copia-e-cola”, onde um RNA intermediário é reversamente transcrito em cópia de cDNA e então, integrado ao genoma. Para a segunda classe é mobilizada por um intermediário de DNA, tanto em mecanismo de “corta-e-cola”, quanto em mecanismo que envolve um intermediário de DNA circular (GOUBERT et al., 2015; BOURQUE et al., 2018, PAÇO et al., 2019). Cada classe é dividida em subclasses que são divididas em outros subgrupos (superfamílias), as subclasses são divididas majoritariamente pelo modo como seu intermediário é produzido e quais

mecanismos estão envolvidos, incluindo por exemplo: endonucleases e elementos marcados pela transcrição reversa (non-LTR); DNAs intermediários em fita dupla e integrases (LTR) ou ainda DNAs circulares e tyrosina recombinase (Crypton) (BOEKE et al., 1985; VITTE e BENNETZEN, 2006; KRAMEROV e VASSETZKY, 2011, ARKHIPOVA, 2017; BOURQUE et al., 2018). Tipicamente as superfamílias são encontradas amplamente propagadas em vários organismos, mas com origem monofilética comum, como por exemplo *Tc1/mariner*, hAt (hobo-Ac-Tam3) e MULEs que são três superfamílias de transposons que estão espalhadas pelos eucariotos (WITHERSPOON e ROBERTSON, 2003; FESCHOTE e WESSLER, 2002). E ainda mais detalhadamente, os TEs podem ser divididos em famílias e subfamílias, que são derivados de uma unidade ancestral única, e podem ter uma sequência consenso representativa para a subfamília inteira (GOUBERT et al., 2015; BOURQUE et al., 2018, PAÇO et al., 2019). Algumas ferramentas que permitem a quantificação e composição dos TEs estão disponíveis, mas a maioria requer uma referência para assemblar e ainda não garante a quantificação das variações entre as diferentes famílias de TEs. Mesmo com uma referência, a recuperação dos TEs pode ser subestimada, pois a natureza repetitiva das sequências é um desafio para os as linhas de comando, que podem não capturar variação e abundância dos *contigs* (GOUBERT et al., 2015; WEILGUNY e KOFLER, 2019; PAÇO et al., 2019). Do ponto de vista cromossômico a prospecção de TEs e seu mapeamento tem sido também realizados, sendo bem estudado em exemplos como em roedores (PAÇO et al., 2013, 2015), milho (ZHONG et al., 2002; NAGAKI et al. 2003; JIN et al., 2004), arroz (CHENG et al., 2002; ZHANG et al., 2004) e alguns estudos recentes em grupos de dípteros (BRACEWELL et al., 2019; CHANG et al., 2019) e gafanhotos (RUIZ-RUANO et al., 2018). Esses estudos nos mostram diferentes padrões de evolução e localização dos TEs e como podem modular e interferir na evolução dos genomas.

1.4. *Ronderosia bergii* como modelo para estudo dos neo-cromossomos sexuais

Estudos com ortópteros possibilitam o entendimento de como os cariótipos estão se modificando e, além disso, como os cromossomos sexuais estão evoluindo, uma vez que algumas espécies apresentam cromossomos novos (considerando o tempo evolutivo) e que ainda estão passando por processos de diferenciação e degeneração. A presença de cariótipos altamente dinâmicos em Ortópteros mostra sua importância como modelos em estudos de genética evolutiva e ainda pode ajudar e responder muitas perguntas relacionadas ao comportamento e evolução dos cromossomos sexuais.

O gafanhoto *Ronderosia bergii* (Acrididae: Melanoplinae) possui cariótipo $2n=22$ com presença de cromossomos neo-YX (macho) e neo-XX (fêmea). Esta espécie tem servido de modelo para entendimento da estrutura e evolução de cromossomos sexuais. O cromossomo neo-Y da espécie é completamente heterocromático e recentemente foi relatada a presença de alguns DNAs repetitivos envolvidos na diferenciação do sistema neo-XY da espécie (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2015b). Além disso, utilizando dados de sequenciamento genômico Palacios-Gimenez e colaboradores (2018) encontraram dez famílias de DNAsat no genoma da espécie, sendo nove delas presentes nos cromossomos sexuais e entre essas, duas foram encontradas exclusivamente no cromossomo neo-Y, mostrando envolvimento com sua evolução. Além disso, os dados indicaram uma complexa evolução do cromossomo sexual neo-Y na espécie ocasionada por múltiplas inversões paracêntricas, causando a ocorrência de variantes não fixadas populacionalmente, e que requerem maior aprofundamento. Esses dados mostraram uma alta variedade para um cromossomo neo-Y já estabilizado, caso que ainda não havia sido descrito em ortópteros. Embora diversos DNAs repetitivos tenham sido descritos no sistema neo-XY de *R. bergii*, grande parte da composição ao longo da inteira extensão deste cromossomo permanece desconhecida. Estes dados instigam a um estudo mais profundo do sistema sexual da espécie para entendimento de sua origem e evolução.

2. OBJETIVOS E METAS

2.1. Objetivo geral

Entender a composição molecular e evolução do sistema sexual neo-XY de *R. bergii* utilizando como marcadores de DNAsat e TEs prospectados por sequenciamento de nova geração e mapeamento por FISH.

2.2. Objetivos e metas específicas

- Analisar o maior número possível de famílias de DNAs satélites e TEs no genoma de *R. bergii* com maior representatividade em um dos sexos a partir de dados do sequenciamento genômico completo e análise de bioinformática e por mapeamento por FISH, a fim de elucidar a composição e mecanismos envolvidos na diferenciação dos cromossomos neo-XY.
- Utilizar os marcadores prospectados para entendimento da variabilidade dos cromossomos sexuais de *R. bergii* do ponto de vista intra-populacional, tentando entender as causas do extenso polimorfismo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico e obtenção de cromossomos

Espécimes machos e fêmeas adultos de *Ronderosia bergii* coletados no campus da Universidade Estadual Paulista em Rio Claro/SP, Brazil (22°24'45" S, 47°31'28" W) já encontram-se armazenados em freezer -20 °C no Laboratório de Citogenética da UNESP/Rio Claro para extração do DNA genômico. Para obtenção de cromossomos, embriões foram obtidos a partir da dissecação do ovo com cerca de 15 dias após a postura e diversos animais encontram-se em caixas de criação para obtenção de novas posturas. Células mitóticas serão obtidas de embriões seguido pelo protocolo proposto por Webb e colaboradores (1978) com pequenas modificações. Células meióticas foram obtidas pelo maceramento de folículos de testículos de machos que foram fixados em Carnoy (3:1, Etanol absoluto: Ácido Acético Glacial). As lâminas serão obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento e coradas com Giemsa 5% para análises convencionais. Posteriormente, lâminas não coradas serão utilizadas para experimentos de FISH e pelo menos 15 metáfases serão analisadas para descrever os padrões de distribuição das sequências repetitivas que foram isoladas.

3.2. Sequenciamento

O DNA do músculo do fêmur da perna saltadora de macho (carregando a variante mais comum no neo-Y para adultos, ver Palacios-Gimenez et al. 2018) e fêmea foi extraído utilizando o kit Qiagen DNeasy kit (Qiagen Inc., CA, USA), seguindo o protocolo dos fabricantes. Os DNAs extraídos foram sonicados para obter fragmentos de aproximadamente 500pb e usados para gerar bibliotecas genômicas paired-ends como recomendadas pela Illumina ((Illumina Inc., San Diego, CA, USA). As bibliotecas foram sequenciadas usando o serviço da Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea), usando o equipamento Illumina Hiseq 4000 paired-end. Cada genoma gerou uma amostra de ~2.4Gb (macho) e ~2.3Gb (fêmea) de 2x101pb. O software Trimmomatic (BOLGER et al., 2014) foi usado para selecionar os reads por uma qualidade mínima de Q20 e tamanho mínimo de 100nt.

3.3. Análise das sequencias repetitivas

Os genomas sequenciados foram usados para análises comparativas do conteúdo repetitivo, focando nas diferenças entre os sexos para obter sequencias enriquecidas nos neo-cromossomos sexuais e adicionalmente suas descrições moleculares. Espera-se que sequencias enriquecidas no neo-Y sejam mais representadas nos *reads* dos machos (neo-XY),

enquanto as sequências enriquecidas no neo-X, sejam mais representadas nos *reads* das fêmeas (neo-XX).

3.3.1. Análise dos DNAsats

Para a prospecção dos DNAsats foi usado o protocolo satMiner (RUIZ-RUANO et al., 2016) que é disponível no site GitHub (<https://github.com/fjruizruano/satminer>). O protocolo consiste em identificar o número máximo possível de DNAsats através de várias rondas de clusterização pelo RepeatExplorer (NOVÁK et al. 2013) seguido de uma filtragem no DeconSeq (SCHIMIEDER e EDWARDS, 2011) dos *reads* previamente recuperados no RepeatExplorer. Para essa análise nós usamos um 150,000 *reads* de cada genoma como *input* no RepeatExplorer e então, seguimos as mesmas opções padrão usadas por Ruiz-Ruano e colaboradores (2016). A partir do *output* do RepeatExplorer nós procuramos manualmente por DNAsats selecionando os que apresentavam gráficos com alta densidade (esféricos ou em formato de anel). Esses clusters foram confirmados como arranjos em tandem pelo Tander Repeat Finder (BENSON 1999) e pela ferramenta de alinhamento dotplot disponível no programa Geneious v4.8. A análise pelo RepeatExplorer foi repetida por mais cinco vezes com adição de 2x50,000 *reads* filtrados em cada interação até que não fossem encontrados novos DNAsats. A busca de homologia entre as sequências de DNAsats foi feita pela uma comparação *all-against-all* do RepeatMasker (SMIT et al., 2017) a partir dos monômeros recuperados, usando o “rm_homology.py” script do python (<https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols>). A classificação das sequências de DNAsat em superfamílias, famílias ou variantes foi feita de acordo com Ruiz-Ruano e colaboradores (2016). Os *reads* recuperados foram usados no Repeat Masker para calcular abundância e divergência de cada DNAsat, comparando genomas de macho e fêmea. A abundância para uma família de DNAsat é calculada pela proporção de nucleotídeos alinhados com sua sequência consenso de referência em proporção com o tamanho total da biblioteca. Para isso, foram usados 11,5 milhões de *reads* pareados randômicos (23 milhões de cada biblioteca) obtidos pela ferramenta seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) para estimar abundância e divergência no RepeatMasker.

3.3.2. Análise dos TEs

Para estimar a abundância e divergência dos TEs entre os genomas de macho e fêmea foi utilizada a linha de comando dnaPipeTE (GOUBERT et al., 2015) que é gratuitamente disponível no site (<https://github.com/clemgoub/dnaPipeTE>). Essa linha de comando é uma

ferramenta para montar *de novo* os TEs já que não requer um genoma montado e usa *input* com baixa cobertura de *reads* (<1x cobertura do genoma). Essa linha de comando usa o programa de montagem Trinity (GRABHERR et al., 2011), seguido por quantificação automática e anotação dos TEs de acordo com o banco de dados do Repbase. O dnaPipeTe também permite a quantificação de elementos repetitivos recentemente ativos nos dados de sequenciamento, ao contrário do RepeatMasker, que quantifica repetições com ampla faixa de idade nos genomas. Para otimizar a quantidade de dados sequenciados para a subamostragem de cada genoma no dnaPipeTe, foram selecionadas subamostragens entre 500,000 e 1,000,000 *reads* em intervalos de 100,000 *reads* (em 6 rodadas) para o genoma do macho. Para cada uma das 6 rodadas, foi selecionada a subamostra que produz o maior *contig* N50 na montagem do Trinity como uma medida da subamostra da leitura otimizada. A subamostra de leitura otimizada no genoma do macho (800,000 *reads*) foi então usada para realizar o dnaPipeTe no genoma da fêmea. Para fazer a anotação dos TEs foi usada a opção -RM_lib do dnaPipeTE com o banco de dados de sequências repetitivas de artropodes (Arthropoda Repbase). O gráfico de *landscape* gerado como *output* do dnaPipeTE representa a distribuição da divergência BLASTn entre os *reads* e os *contigs* em que estão mapeados.

3.5. Amplificação dos DNAs repetitivos por PCR

Nós selecionamos as sequências (DNAsats e TEs) que na análise comparativa (macho x fêmea) estavam mais representadas em um dos sexos para prosseguir com isolamento por PCR e mapeamento por FISH (ver próximo tópico). As sequências consenso obtidas de cada família foram usadas para desenhar *primers* “divergentes” para DNAsat e “convergentes” para TEs (disponível no material suplementar no manuscrito). Os primers foram desenhados manualmente ou usando o programa Geneious.

O DNA genômico de machos foi usado para amplificar os elementos repetitivos por PCR usando o mix: 10× PCR Rxn Buffer, 0.2 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTPs, 2 mM de cada *primer*, 1 U of *Taq* Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, San Diego, CA, USA), e 50–100 ng/μL de DNA. As condições de PCR incluem a desnaturação inicial em 94 °C por 5 min e 30 ciclos a 94 °C (30 s), 55 °C (30 s), e 72 °C (80 s), seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos resultantes da PCR foram separados em gel de agarose 1%. As bandas referentes aos monômeros serão isoladas e purificadas com o kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes e usadas para reamplificação por PCR.

3.6. Híbridização *in situ* fluorescente

As sequências de DNAs satélites e TEs obtidas por PCR foram marcadas com Biotina 14-dATP (Invitrogen) ou Digoxigenina 11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) através da *nick translation* seguindo recomendações do fabricante. A sonda telomérica foi obtida por PCR sem DNA (non-template) usando *primers* auto-complementares (TTAGG)₅ e (CCTAA)₅ de acordo com Ijdo e colaboradores (1991).

Lâminas não coradas de preparações mitóticas e meióticas foram usadas para FISH simples ou dupla, seguindo protocolo de Pinkel e colaboradores (1986), com modificações (CABRAL-DE-MELLO et al., 2015). As sondas marcadas com digoxigenin-11-dUTP foram detectadas usando anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) e as marcadas por biotin-14-dATP foram detectadas com Alexa Fluor 488-conjugated (Invitrogen). Todas as preparações serão contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole) e montadas com meio de montagem VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram observadas utilizando-se um microscópio Olympus BX61 equipado com uma lâmpada fluorescente e filtros adequados. As imagens foram documentadas utilizando uma câmera digital DP70 em escala cinza e adicionalmente pseudocoloridas. As imagens foram sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste usando-se Adobe Photoshop CS6. Para descrever padrões e distribuição de DNAsats e TEs ao menos 14 metáfases foram analisadas.

3.7. Desenho experimental para localização de DNAsats e variabilidade dos neo-cromossomos sexuais.

Primeiramente, os DNAsats com abundância diferencial entre os genomas de macho e fêmea foram mapeados em células meióticas (metáfase I) de indivíduo adulto portador da variante neo-Y tipo II, que é a mais comum entre os adultos (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2018). Posteriormente, tendo conhecimento da variabilidade para o cromossomo neo-Y reportada por Palacios-Gimenez e colaboradores 2018, os DNAsats com sinais nos cromossomos neo-Y e/ou neo-X, a sonda telomérica e também dois DNAsats Rber249 (nova nomenclatura RbeSat25-166) e Rber299 (nova nomenclatura RbeSat23-285) previamente encontrados foram mapeados em embriões da mesma e de distintas ootecas para observar a variabilidade dos cromossomos sexuais. Foi usado um total de 20 embriões, oito foram selecionados aleatoriamente de distintas ootecas e doze foram selecionados de quatro ootecas individuais (três embriões de cada). Cada embrião foi usado para produzir nove lâminas, para permitir o mapeamento de todos os DNAsats e sonda telomérica usando dupla FISH. Isso nos permitiu verificar as variações encontradas no neo-Y e então selecionamos um indivíduo

portador do neo-Y mais comum para realizar um experimento e ver como os DNAsats estão localizados em relação com o outro no cromossomo neo-Y. Para isso, usamos duas lâminas de preparações do mesmo embrião e hibridizamos e fotografamos cada lâmina depois de uma rodada de FISH com diferentes DNAsats. Após cada experimento de FISH, as lâminas foram removidas e as sondas foram lavadas por três vezes em 4xSSC com 1% Triton-100, por 5 min cada. Posteriormente, procedendo com refixação em formaldeído 3,7% em 1xPBD e seguindo com o protocolo padrão para FISH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o mestrado são apresentados e discutidos no manuscrito: *The high dynamism for neo-sex chromosomes is mediated by multiples chromosomal rearrangements and repetitive DNAs in the grasshopper *Ronderosia bergii**, a ser submetido para a revista *Chromosome Research* (ISSN: 1573-6849)

4.1. Manuscrito

The high dynamism for neo-sex chromosomes is mediated by multiples chromosomal rearrangements and repetitive DNAs in the grasshopper *Ronderosia bergii*

Ana B. S. M. Ferretti¹, Diogo Milani¹, Octavio M. Palacios-Gimenez^{2,3}, Francisco J. Ruiz-Ruano^{2,3}, Diogo C. Cabral-de-Mello^{1,*}

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

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

³Department of Ecology and Genetics, Uppsala University, Evolutionary Biology Centre, Uppsala, Sweden

Abstract

A common characteristic of sex chromosome evolution is the accumulation of repetitive DNAs, which could account for their diversification and degeneration. In grasshoppers the ancestral sex chromosome system is XO, but in some species neo-XY sex chromosome emerged by Robertsonian translocation between the ancestral X and one autosomal pair. This is the case of the Melanoplinae *Ronderosia bergii* that additionally present a large pericentric inversion in the neo-Y, making this a singular species to understand evolution of sex chromosomes. Here we characterized the repeatome (satellite DNAs, satDNA; Transposable Elements, TEs) of the species focused in the understanding of differences between male and female genomes that are putatively associated with sex chromosomes. We found a total of 54 satDNA families and 56 families of TEs. The satDNAs were 13.5% more abundant in male genomes, while TEs were only about 1.02% more abundant in female genome, evidencing high amplification of satDNAs on neo-Y chromosome and minor role of TEs in sex chromosome differentiation. The high differentiation between the sex chromosomes is demonstrated by amplification of multiply satDNAs in neo-Y and occurrence of families exclusively mapped on this chromosome, although some degree of homology was noticed. Our data of chromosomal mapping of satDNAs evidenced high turnover of neo-sex chromosomes in *R. bergii* at intrapopulation level, caused by multiples paracentric inversions and other rearrangements like amplifications and transpositions. Finally the species is an experimental example of the action of repetitive DNAs after the suppression of recombination in the generation of variability for sex chromosomes and is a helpful model to understand sex chromosome evolution at intrapopulation level.

Key-words: satellite DNA, transposable elements, neo-Y, intrapopulation variation, orthoptera

Introduction

Sex chromosomes are one of the most dynamic parts of genomes, including their repetitive DNA content (Steinemann and Steinemann 2005, Graves 2008, Matsunaga 2009, Hobza et al. 2017). These chromosomes were originated from an ordinary pair of autosomes independently during evolution of diverse groups and they present distinct evolutionary fates (Charlesworth 2017, Wright et al. 2016, Bachtrog 2013, Bachtrog et al. 2011). After the first step involved in sex chromosome origin, i.e. acquisition of a sex-determining locus in one of the homologous of an autosomal pair, with subsequent accumulation of beneficial sex-specific alleles for one sex that is deleterious to another sex, characteristically sex chromosomes suppress recombination around sex determination locus and accumulate repetitive DNAs (Bachtrog et al. 2014; Wright et al. 2016; Charlesworth 2017). Moreover, occurrences of large chromosomal rearrangements (inversions, translocations and fusions) are documented. These processes account for heterochromatinization and degeneration, that could result in heteromorphization of sex chromosomes and that lead to differences in comparison to autosomes (Ellegren 2011, Bachtrog 2013, Charlesworth 2017).

After establishment of sex chromosomes, cases of loss of the heteromorphic element (Y or W) were documented, leading to emergence of XO or ZO sex systems, as in most insects and worms (Blackmon and Demuth 2014, 2015b, Blackmon et al. 2017, Daish and Grützner 2019). Furthermore, established sex chromosomes could be involved in fusion or translocation with autosomes resulting in newly evolved sex chromosomes, like simple neo-XY or neo-ZW, besides multiple sex system (Charlesworth et al. 2005; Veltsos et al. 2008). Interestingly, origin of neo-sex chromosomes can result in gain of new Y or W in some species that lose them ancestrally, as documented during the transition from ZO to neo-ZW in in lepidopterans or from XO to neo-XY in orthopterans (Traut et al. 2008, Marec et al. 2010, Castillo et al. 2010, Bidau and Marti 2001, Blackmon et al. 2017).

Among grasshoppers (Orthoptera) the XO (male)/XX (female) sex system is the most common, but in representatives of Melanoplinae (Orthoptera) high frequency of transition to neo-sex chromosome systems were documented (Castillo et al. 2010). Interestingly within the monophyletic group *Ronderosia*, chromosomal rearrangements led to the origin of neo-sex systems, including simple (neo-XY) and multiply systems (neo- $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$). In some members of *Ronderosia*, the origin of the simple neo-XY system involved independent centric fusion of distinct autosomes with the ancestral X chromosome, while others share the ancestral fusion involving the same autosome pair. Moreover, in *R. dubia* evolved a multiple neo- X_1X_2Y sex system by a second centric fusion between the neo-Y and an autosomal pair.

In *R. bergii*, besides the fusion that originated the karyotype $2n=22,neo-XY$ a large pericentric inversion on the neo-Y and complete heterochromatinization of this element took place (Castillo et al. 2010, Palacios-Gimenez et al. 2015, 2018). Differentially from neo-Y on neo-X chromosome the C-positive blocks are placed on terminal and pericentromeric and in autosomes the heterochromatin occupy primarily the pericentromeres. The composition of the *R. bergii* neo-Y chromosome was studied in more details (Palacios-Gimenez et al. 2015, 2018) and interestingly using two satellite DNAs (satDNA) it was noticed occurrence of multiple paracentric inversions in the neo-Y resulting in cryptic polymorphisms in one population located at Rio Claro, São Paulo/Brazil (Palacios-Gimenez et al. 2018). This high polymorphism instigates a deeper analysis of the sex chromosomes of this species that could be a good model to study the dynamism of sex chromosomes at intra-population level.

With advance of Next Generation Sequencing (NGS) technology and bioinformatic tools it is possible to identify and characterize repetitive DNA genome portion, allowing a better picture about chromosomal organization and evolution of this DNA fraction. This assay has been used successfully in recent works in many species to elucidate evolutionary ongoing of sex chromosomes (Palacios-Gimenez et al. 2018, Schemberger et al. 2019, Lisachov et al. 2019, Rodríguez et al. 2019). In this way, extending the earlier work we aimed to understand in deeper details the molecular composition and evolutionary history of the intriguing sex chromosomes of *R. bergii*. For this we characterized the repeatome (including satDNAs and Transposable Elements, TEs) of the species by integration of computational and cytogenetic tools, focused in the differential composition between sexes. Our data support for accumulation of various satDNA families exclusively in the neo-Y chromosome and paucity of TEs in both sex chromosomes. Furthermore, extensive reshuffling for the neo-X and neo-Y at intra-population level was evidenced, mainly as result of reorganization of satDNAs. We hypothesize the possible mechanisms involved in the origin of multiply variants of the neo-sex chromosomes.

Material and methods

Sample collection and chromosome preparations

Males and females of *R. bergii* were collected in the campus of São Paulo state University in Rio Claro/São Paulo (SP), Brazil ($22^{\circ}24'45''$ S, $47^{\circ}31'28''$ W). Adult males were anesthetized and the testis follicles were dissected and fixed in modified Carnoy's solution (3:1, Absolute Ethanol: Glacial Acetic Acid). Testis follicles were used for meiotic chromosome obtaining. Some females were maintained in captivity until oviposition. After

approximately 15 days from egg-laying oothecae were dissected for embryo neuroblasts obtaining for mitotic chromosome acquisition, according to Webb et al. (1978). Whole animals were stored in 100% ethanol for DNA extraction. The material was stored in freezer at -20 °C until use. The slides were obtained by maceration of follicles or embryo in a drop of 50% glacial acetic acid followed by spreading on a hot plate at 40-45 °C.

Genome sequencing

Genomic DNA of adult male (harboring the neo-Y variant type II that is the most common among adults, see Palacios-Gimenez et al. 2018) and adult female individuals was extracted from femurs (saltatory legs) using Qiagen DNeasy kit (Qiagen Inc., CA, USA), following the manufacturer's protocol. The extracted DNAs were sonicated to obtain ~500pb and used to generate paired-ends genomic library as recommended by Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The libraries were sequenced using a service of MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea) through Illumina HiSeq 4000 paired-end. Each sample yielded ~2.4Gb (male) and ~2.3Gb (female) of 2x101bp. Trimmomatic software (Bolger et al. 2014) was used to perform the quality trimming of the reads at Q20 and minimum length of 100 nt.

SatDNA analysis

The sequenced genomes were used for comparative analysis of satDNAs, focused on differences between sexes in order to obtain sequences enriched on neo-sex chromosomes and description of their molecular composition. Sequences enriched on neo-Y are expected to be more represented in male (neo-XY) reads than in female (neo-XX) reads, while sequences enriched on neo-X should be putatively more represented in female than in male genomes. For satDNA prospection, we used the satMiner protocol (Ruiz-Ruano et al. 2016) freely available in GitHub (<https://github.com/fjruizruano/satminer>). The protocol consists in identify the maximum number possible of satDNAs by several rounds of clustering in RepeatExplorer (Novák et al. 2013) following by DeconSeq (Schmieder and Edwards 2011) to filtering reads previously assembled in RepeatExplorer. For this analysis, we used 150,000 reads of each genome as input in RepeatExplorer, and then we followed the same default options used by Ruiz-Ruano et al. (2016). From RepeatExplorer output we searched for satDNAs selecting those clusters that had high graph density (spherical or ring-shaped format). Those clusters were confirmed as tandemly arranged satDNAs by Tandem Repeat Finder (Benson 1999) and dotplot alignment tool implemented in Geneious v4.8 software. RepeatExplorer analysis were processed five times adding 2x50,000 filtered reads in each

interaction, until no new satDNA was detected. To search for homologous satDNAs, we performed an all-against-all RepeatMasker (Smit et al 2017) comparison of the recovered satDNA monomers, using the “rm_homology.py” python script (<https://github.com/fjruizruano/ngs-protocols>). Then, we classified satDNAs sequences into superfamilies, families or variants according to Ruiz-Ruano et al. (2016).

We used RepeatMasker as the reads mapper to calculate abundance and divergence of each satDNA, comparing the female and male genomes. We calculated the abundance for a given satDNA family as the proportion of nucleotides aligned with the reference consensus sequence in respect to total library size. To this end, we used 11.5 millions of random raw read pairs (23 millions of each library) obtained by seqtk tool (<https://github.com/lh3/seqtk>) to estimate abundance and divergence in RepeatMasker. All reads were mapped to dimers of satDNAs consensus sequences, and for those smaller ones, several monomers were concatenated until reaching roughly the reads length. We used the generated alignment files to estimate the Kimura 2-parameter distances (K2P) of each satDNAs fragment against its consensus sequences, using the calcDivergenceFromAlign.pl script from the RepeatMasker utility tool. To visualize the temporal accumulation of satDNAs across sexes, we generated repeat landscape depicting the relative abundance of repeat elements on one axis and the K2P distance from the consensus on the other axis. Recently amplified elements are unlikely to have accumulated a large number of mutations that differentiate them from their consensus sequences. The relative age thus was calculated as the K2P genetic distance between satDNA pair.

Transposable elements (TEs) quantification

We used dnaPipeTE pipeline (Goubert et al. 2015) freely available at GitHub (<https://github.com/clemgoub/dnaPipeTE>) to estimate TE abundance and divergence across male and female genome. DnaPipeTE is suitable tool to *de novo* assembly of TEs since it does not require genome assembly and uses low-coverage raw reads as input (<1x genome coverage). It uses Trinity (Grabherr et al. 2011) as assembler, followed by automatic quantification and annotation of TEs in sequencing raw reads together with Repbase database. DnaPipeTE thus allows the quantification of recently active repeat elements in sequencing data, unlike RepeatMasker which quantifies repeats with a wide range of ages across genome. To optimize the amount of sequencing data for dnaPipeTE subsampling of each genome, we selected the male genome and ran dnaPipeTE on subsamples ranging between 500,000 and 1,000,000 reads in intervals of 100,000 reads (6 runs). For each of the 6 runs in male genome,

we selected the subsample yielding the highest contig N50 metric in the Trinity assembly step of dnaPipeTE, as a measure of optimized read subsampling. The optimized read subsample in male genome (800,000 reads) was then used to run dnaPipeTE on the female genome. We annotated TEs using the -RM_lib option in dnaPipeTE with Arthropoda Repbase as database and a not published custom database generated from grasshopper genomes. The dnaPipeTE output landscape graph (TE age distribution) depicts the BLASTn divergence distribution between reads and the contigs on which they map.

Amplification of repetitive sequences through PCR

We selected the sequences (satDNAs and TEs) that by comparative bioinformatics analysis (male vs female) were more represented across sexes to proceed with PCR isolation and FISH mapping (see next topics). We used the obtained consensus sequences of each repeat family to design divergent primers for satDNAs and convergent ones for TEs (Supplementary File 1). Primers were designed manually or using Geneious software.

Genomic DNA of males was used to amplify the repetitive elements by PCR using the mix: 10× PCR Rxn Buffer, 0.2 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTPs, 2 mM of each primer, 1 U of *Taq* Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, San Diego, CA, USA), and 50–100 ng/μL of template DNA. The PCR conditions included an initial denaturation at 94 °C for 5 min and 30 cycles at 94 °C (30 s), 55 °C (30 s), and 72 °C (80 s), plus a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were separated at 1% electrophoresis agarose gel. The monomeric bands were isolated and purified with Zymoclen™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA), following fabricant recommendations and used as source for reamplification through PCR. PCR products were sequenced by Sanger method using the service of Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) to check the correct amplification of desired sequence.

Fluorescent *in situ* hybridization

The sequences of each satDNA or TEs obtained through PCR were labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) or biotin-14-dATP (Invitrogen) by nick translation. Telomeric probe was obtained by non-template PCR using self-complementary primers (TTAGG)₅ and (CCTAA)₅ according to Ijdo et al. (1991).

Unstained slides of meiosis or mitosis preparations were used to single or two-color FISH following the Pinkel et al. (1986) protocol with modifications (Cabral-de-Mello 2015). Probes labeled with digoxigenin-11-dUTP were detected using anti-digoxigenin-Rhodamine

(Roche), while probes labeled with biotin-14-dATP were detected with Streptavidin Alexa Fluor 488-conjugated (Invitrogen). After FISH, preparations were counterstained with 4',6-diamidino-2'-phenylindole (DAPI) and mounted in VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA). The slides were observed using an Olympus microscope BX61 equipped with fluorescence lamp and appropriate filters. The images were documented with a DP70 cooled digital camera in grayscale and then pseudo-colored. Images were merged and optimized for brightness and contrast with Adobe Photoshop CS6. To describe the patterns of satDNA and TEs distribution at least 15 metaphases were analyzed.

Experimental design for analysis of satDNAs location and of neo-sex chromosomes variability

First we mapped the satDNAs with differential abundance between male and female genomes in meiotic cells (metaphase I) of one adult individual harboring the neo-Y variant type II, which is the most common variant among adults (Palacios-Gimenez et al. 2018). After, bearing in mind the variability for the neo-Y chromosome reported by Palacios-Gimenez et al. (2018) we mapped satDNAs with signals on neo-Y or neo-X chromosomes plus satDNAs Rber248 (new nomenclature RbeSat25-166), Rber299 (new nomenclature RbeSat23-285) and telomere motif in embryos from the same ootheca and from different ootheca to check variability of sex chromosomes. We used a total of 20 embryos, eight selected randomly from distinct oothecas and 12 selected from four individual oothecas (three per ootheca). Each embryo was used to produce nine slides, to allow the mapping of all satDNAs and telomeric probe by two color FISH. This enabled us to define the position of each satDNAs on the neo-Y. We then performed an experiment to see how the satDNAs are located in relation to each other on the neo-Y chromosome. For this, we used two slides prepared from the same embryo (with the most common neo-Y chromosome) and hybridized and photographed each slide after FISH rounds with different satDNAs. After each FISH experiment, we removed the coverslips and probes by three washes, 5 minutes each, in 4xSSC and 1%Triton-100. After that, we proceed the refixation in formaldehyde 3.7% diluted in wash-blocking buffer (0.4XSSC, 0.1% Triton C and 1% skimmed milk) following the standard protocol of FISH.

Results

Computational satellitome characterization

Computational analysis of repetitive DNAs from male and female genomes revealed occurrence of a total of 54 satDNA families, in which 53 were shared between sexes (Figure 1a,b). Among the 54 satDNA families 31 were more enriched in one specific genome (male or female), 27 were more abundant on male genome, suggesting enrichment on neo-Y chromosome, while four were more abundant in female genome, putatively enriched on neo-X chromosome (Table 1, Figure 1e). We used as threshold to consider a satDNA more abundant in one genome when the family was at least 1.1 times more abundant in one of the genomes, considering the quotient between abundance in the sexes. These sequences were used in FISH analysis. Similarity sequence comparison between the 54 satDNAs revealed only two similar families, the satDNA RbeSat07-277 and RbeSat13-214, which were grouped in on superfamily (SF), the other satDNA families did not revealed similarity between 50-80% to be grouped in SF. They correspond to about 2.77% and 2.44% of male and female genomes, respectively. Monomer length was variable from 11 bp to 748 bp and A+T content was on average 58.90% (range from 36.40-79.40%). The satDNAs were named in decreasing order of abundance based on male genome. The ten satDNAs previously identified by Palacios-Gimenez et al. (2018) were renamed to follow this criterion. The most abundant satDNA (RbeSat01-53) represented 0.36% of male genome and 0.43% of female genome, and the least abundant satDNA was the RbeSat54-22 representing only 0,000015% of male genome and it was not detected in female genome. Divergence between satDNA families was 8.58% on male genome and in female it was 10.24%, on average. The less divergent satDNA for the male genome was RbeSat36-222 with 1.02%, and for female genome it was RbeSat52-176 with 1.43%. The highest divergence for male genome was on satDNA RbeSat17-175 (23.72%), while for female genome was on RbeSat21-209 (24.54%). More detailed data about satDNAs are summarized in table 1.

Computational characterization of the mobilome

The TEs were much more abundant in comparison to satDNAs in both male and female genomes. However the difference between sexes were lower, suggesting less accumulation on sex chromosomes (Figure 1c,d). We were able to identify a total of 66 families, corresponding to 52.74% of male and 53.72% of female genomes. The most abundant TE was a LTR/Gypsy (corresponding to 8.47% of male and 8.15% of female genomes) (Supplementary File 2). Considering the high dynamism and large amount of TEs in grasshopper genomes, in general

with occurrence with spread distribution along euchromatin (see for example Palacios-Gimenez et al. 2014, Montiel et al. 2012) we used as threshold to consider higher abundance in one genome at least five times in copy number. In this way none of the families were highly enriched in one of the sexes, but when we analyzed the subfamilies differences were noticed. Following the same criterion used for define higher abundance of TEs families a total of ten subfamilies were more enriched in one of the sexes, six in male and four in female (Figure 1f). Although enriched in one of the sexes these subfamilies were represented only by small proportion in the genomes, as maximum of 0.33% in male and 0.37% in female (Supplementary File 3).

Chromosomal location of satDNAs and TEs with differential abundance between sexes

As we aimed to know the repetitive DNA composition and their organization on sex chromosomes we selected for FISH mapping repeats that were enriched in one of the sexes, according to genomic analysis. In this way, from 31 satDNA, 27 were selected. Four of them were excluded because they were previously mapped, RbeSat08-11 (previous name Rber61), RbeSat12-176 (Rber158), RbeSat37-22 (Rber185), RbeSat40-16 (Rber370) (Palacios-Gimenez et al. 2018). Although the RbeSat23-285 (Rber299) and RbeSat25-166 (previous name Rber248) were previously mapped we used them in FISH experiments to compare the neo-Y variants with descriptions from Palacios-Gimenez et al. (2018).

To have an initial scenario of satDNA chromosomal location, all 27 satDNAs were mapped on metaphase I of one individual harboring neo-Y variant type II (Palacios-Gimenez et al. 2018), the most common neo-Y variant of adults, revealing occurrence of loci on sex chromosomes for 14 of them; five were located exclusively on autosomes and eight did not revealed FISH marks (Table 1). Among the satDNAs with loci on sex chromosomes we identified seven exclusively placed on neo-Y, none of them were exclusive for neo-X, three were located on neo-X and neo-Y, one was located on neo-X and autosomes, and one was located on neo-Y and autosomes (Supplementary File 4). Afterwards to know in detail the distribution of satDNA families newly identified we mapped eleven families plus the families RbeSat23-285 (Rber299) and RbeSat25-166 (Rber248) on one embryo harboring neo-Y variant type I, the most common variant among embryos (Palacios-Gimenez et al. 2018). Two satDNAs were exclusively located on the short arm, RbeSat19-162 near to terminal region and RbeSat35-374 occupying its entire extension. On centromere occurred the RbeSat09-216 and RbeSat10-272. One locus of the satDNAs RbeSat34-312, RbeSat10-272, RbeSat15-289 and RbeSat18-239 occurred on the middle of long arm. The other satDNAs (RbeSat21-209,

RbeSat25-166, RbeSat03-391, RbeSat44-296, RbeSat23-285) besides one loci of RbeSat34-312, RbeSat10-272, RbeSat15-289 and RbeSat18-239 were grouped on the first half of long arm, except the RbeSat36-222 that presented additional band in the second half of long arm. The telomere occurred on terminal regions (Figure 2). The ten TEs subfamilies enriched in one of the sexes by computational analysis did not revealed signals in FISH experiments (results not shown). It could be due to the low abundance of these sequences in the genomes or due to scattered organization, which is below the threshold for FISH resolution.

satDNA landscape of neo-Y

For the sat DNAs exclusively located on neo-Y chromosome (based in FISH data), i.e. RbeSat03-391, RbeSat21-209, RbeSat23-285, RbeSat25-166, RbeSat34-312, RbeSat36-222, and RbeSat44-296, we generated comparative landscapes between sequenced found in female and male genomes. The seven satDNA presented low divergence in male genome and were more abundant in comparison to female. Additionally, the RbeSat03-391 presented besides monomers with low divergence occurrence of highly divergent copies (Figure 3).

SatDNA mapping reveals variable neo-sex chromosomes

The mapping of satDNAs in distinct embryos revealed variability in regard of distribution of satDNAs on neo-sex chromosomes. Among 20 male embryos we observed eight distinct neo-Y chromosomes in comparison to satDNA distribution presented in figure 2, which correspond to the most common variant (occurring in twelve embryos). Based in the analysis of Palacios-Gimenez et al. (2018) it corresponds to the neo-Y variant I. Only slight differences were observed for two embryos that revealed additional centromeric locus for RbeSat15-289 (Figure 4a) and for one embryo with repositioning of RbeSat36-222 and RbeSat15-288 (Figure 4b). On the other hand, extensive reshuffling was noticed for other five neo-Y variants, as follows: three embryos with repositioning of satDNAs RbeSat23-285, RbeSat15-288, RbeSat36-222, RbeSat10-272 and RbeSat18-239, but among these three embryos the RbeSat15-288 and RbeSat36-222 occupied two distinct positions (Figure 4c,d); one embryo that besides repositioning for these five satDNAs also presented an additional subterminal locus on long arm for RbeSat25-166 and one centromeric band for RbeSat15-288 (Figure 4e); finally one embryo with repositioning of satDNAs RbeSat23-285, RbeSat36-222, RbeSat10-272 and RbeSat18-239, and with additional locus for RbeSat25-166, and repositioning plus additional loci for RbeSat15-288 (Figure 4f) was observed. Interestingly

among these embryos with distinct neo-Y chromosomes three belonged to the same ootheca (Figure 4c,d).

The neo-X chromosome from the 20 male embryos studied presented small signals (dot like), variable in position and loci number. We followed the classification from White (1973) to describe neo-X chromosome arms, i.e. XL is the ancestral X and XR is the arm that shares homology with neo-Y. Considering this, the short arm is XR, while long arm is XL. The satDNAs RbeSat12-176, RbeSat25-166, RbeSat26-141, RbeSat03-391, RbeSat44-296, RbeSat34-312, and RbeSat23-285 did not revealed loci on the neo-X chromosome (results not shown). On the other hand, in all embryos the satDNAs RbeSat07-277, RbeSat10-272, RbeSat09-215, RbeSat15-288, and RbeSat19-162 were placed on neo-X (Figure 5a). The RbeSat07-277 occurred invariably in terminal region of XL; RbeSat10-272 occurred invariably on proximal region of XR; RbeSat19-162 occurred invariably in termini of XR; RbeSat09-215 revealed multiply loci occurring in both arms, variably in terminal, interstitial or proximal regions; RbeSat15-288 occurred as single or multiply loci, exclusively in the XR or in both arms. Finally, the satDNAs RbeSat35-374, RbeSat18-239 occurred in some neo-X but not in others (Figure 5b). RbeSat35-374 and RbeSat19-162 when present occurred as single locus terminally located on XR; RbeSat18-239 occurred mainly as single loci on XR or XL with terminal or interstitial location, but in one embryo two loci (subterminal and interstitial) on XR was observed. All variations observed were between individuals and no intraindividual variability was noticed for both neo-X or neo-Y chromosomes. Some satDNAs with loci observed on neo-X chromosome and autosomes identified in embryos were not well visualized on meiotic chromosomes (metaphase I) probably due to high condensation state and signal size or there is a population variability for presence and absence of loci.

Discussion

Analysis of repetitive DNA composition between sexes associated with chromosomal mapping help in the understanding of sex chromosome composition and differentiation. In grasshoppers repetitive DNA composition of sex chromosomes was mostly analyzed in species with XO/XX sex system and in this way differentiation of neo-sex systems are not well known (Palacios-Gimenez et al. 2013, 2015, 2018). In this work, we recovered the abundant repetitive DNAs with differential accumulation on specific sex of the grasshopper *R. bergii* (neo-XY sex chromosome system) and verify that some satDNAs are enriched on neo-X and neo-Y chromosomes, six and eleven, respectively. Besides these satellites the neo-Y chromosome is also enriched of four other satDNAs and in the neo-X chromosome it was

reported the enrichment of other seven clustered satDNAs (Palacios-Gimenez et al. 2018). Moreover we noticed that TEs are not highly differentially enriched on neo-X or neo-Y, with just few TEs enriched in one specific sex, as revealed by computational analysis. Our data allowed discussing mainly about i) the molecular divergence between neo-X and neo-Y; ii) possible driving forces acting for sex chromosomes differentiation and variability at population level, clarifying the evolutionary history of the intriguing sex chromosome system in *R. bergii*.

Besides the satDNAs and TEs described here, the U2 snDNA and H3 histone genes and some microsatellites were differentially enriched in one of the sex chromosomes of *R. bergii* (Palacios-Gimenez et al. 2015). The accumulation of distinct classes of repetitive DNAs is a common pattern along independent evolution of sex chromosomes. In this way, high accumulation of distinct satDNA families, as observed here, was reported, for example in *Eneoptera surinamensis* (Palacios-Gimenez et al. 2017), lizards (Giovannotti et al. 2018) and *Megaleporinus macrocephalus* (Utsunomia et al. 2019). On the other hand, high involvement of TEs in sex chromosome evolution was noticed in much other species, like *Drosophila miranda* (Bachtrog et al. 2019) and *Apareiodon* sp. (Schemberger et al. 2019) differing from *R. bergii* that the low accumulation of TEs suggest minor involvement of this class of repetitive DNA in comparison to satDNAs in the differentiation of sex chromosomes. The TEs differentially enriched on one specific sex represented just low amount of the *R. bergii* genome and no signals through FISH analysis were observed, probably due to physical arrangement of these sequences, not forming visible clusters. In this way, we can not completely rule out the occurrence of TEs on sex chromosomes with scattered organization. It is not well-known if accumulation of repetitive DNAs favor suppression of recombination or if the repetitive DNA accumulation and amplification occurred as a result of recombination suppression, but the interaction of these processes can allows rearrangements to occur more freely, leading to accumulation of mutations that gradually promotes the degeneration and differentiation of Y or W chromosomes (Ezaz and Deakin 2014, Charlesworth 2017, Daish and Grützner 2019). In *R. bergii* the sex chromosomes maintain contact from late pachytene by terminal region of short arms of neo-X (XR) and neo-Y, that could be due homology for these regions. This is supported by the sharing of a specific satDNA family exclusively located in the terminal region of these chromosomes. The association of neo-sex chromosomes of *R. bergii* is singular in *Ronderosia* species (Castillo et al. 2014) as consequence of a large pericentric inversion, which could favor the suppression of recombination and ultimately accumulation of satDNAs, causing differentiation.

Considering the satDNAs mapped here and previously studied (Palacios-Gimenez et al. 2018), we can observe three main patterns of chromosomal distribution: i) exclusive of neo-Y chromosome; ii) highly amplified on neo-Y chromosome and dot signals in chromosomal arms of neo-X and autosomes; iii) amplified at centromeres of neo-X and some autosomes. These data support for extensive differentiation between the sex chromosomes by differential accumulation of satDNAs, mainly due to high amplification in neo-Y chromosome that is in accordance with its heterochromatic nature (Palacios-Gimenez et al. 2015). Among the satDNAs enriched on neo-Y seven were exclusively mapped on this chromosome (FISH data) and presented high homogeneity (low level of K2P, see results), indicating clearly recent amplification, i.e. after origin of neo-sex chromosomes. The occurrence of these satDNA families in low abundance in female genome suggests that they were present in the genome before establishment of neo-Y, and they were amplified during neo-Y evolution. Interestingly for RbeSat03-391 the abundance is higher in comparison to other six elements, it presented more similar abundance between sexes and the landscape revealed two peaks, one with low divergence (exclusive from male repeats) and another with higher divergence (including male and female repeats). It is indicative of occurrence of different monomers and amplification of one specific variant on the neo-Y chromosome, in regard to other chromosomes. The absence of FISH signals on other chromosomes, than neo-Y, could be attributed to low number of copies, but it could also be due differential arrangement, i.e. scattered distribution, in the case of RbeSat03-391.

The similarity of centromeres of neo-X chromosome and autosomes indicates that the neo-X chromosome preserved its ancestral composition, while the neo-Y suffered composition turnover. Although, highly differentiated the neo-sex chromosomes share some degree of similarity, and besides the occurrence of terminal satDNA exclusively shared between neo-X and neo-Y chromosomes (RberSat35-374) these chromosomes share also other five satDNA families, which are restrict to discrete areas of neo-X chromosome and are also shared with autosomes. The sharing of a RberSat35-374 and RberSat19-162 in terminal region of XR (short arm of neo-X) and neo-Y, besides other shared satDNAs suggest ancestral homology for the ancient autosome involved in the origin of neo-sex system, that was preserved. As our data supported here for *R. bergii* mechanisms like insertion, transposition, inversion and amplification of repetitive sequences are a convergent characteristic observed for differentiation of sex chromosomes (Charlesworth 2017, Daish and Grützner 2019). Exceptionally these mechanisms generated a singular high diversity for

the neo-sex chromosomes in the species, with occurrence of multiply variant in the same population.

Distinct variants for neo-Y was documented in *R. bergii*, which was supposed that emerged mainly from paracentric inversions (Palacios-Gimenez et al. 2018). Our mapping of satDNAs support that the turnover of neo-Y chromosome in the species is much more complex, involving besides multiply paracentric inversions combinations with other rearrangements like amplifications and transpositions. It is believed that repetitive sequences can mediate inversion by bringing the chromosomal arm closely, facilitating intrachromosomal rearrangements, likewise, the non-homologous or ectopic recombination and translocation breakpoints that affects preferentially repetitive regions, or between those (Li et al 2016, Raphael 2012, Christmas et al. 2019, Skinner and Griffin 2012, Molnár et al. 2011). These events generated highly variable distribution of satDNAs between individuals of *R. bergii*, mainly for the 2/3 of long arm of neo-Y. On the lesser extend, similar situation, with occurrence of some variants, was also observed for the neo-X chromosome, but for this chromosome our data suggest that only amplification of minor amount of satDNAs took place in chromosomal arms. Interestingly this high variability for satDNAs on neo-sex chromosomes occurred at intrapopulation level, a pattern not well documented. Variability for sex chromosomes, and putative role of repetitive DNAs in sex chromosome differentiation at intrapopulation level as noticed for *R. bergii*, were revealed in other few species based in a more superficial analysis, like in *Mazama gouazoubira*, Cervidae (Valeri et al. 2018), by analysis of heterochromatin distribution and in *Omophoita aequinoctialis*, Coleoptera by C-banding and mapping of few repetitive probes, i.e. 18S, 5S rDNAs (Goll et al. 2017).

In summary, our data supported for a high differentiation of sex chromosomes in *R. bergii* caused primarily by action of satDNAs and events like inversions, amplification and transpositions. The extensive role of satDNAs for neo-sex chromosome evolution could be exemplified by the presence of 21 families in the neo-sex chromosomes (39% of families found in the genome of the species). Especially for neo-Y the amplification of satDNAs is evidenced by occurrence of 13.5% more satDNA in male genomes. Moreover, seven satDNAs families were exclusively located on neo-Y, which accounted for its differentiation for the rest of the genome. The turnover of sex chromosomes in the species caused emergence of multiplies variants of neo-X and neo-Y at population level, being *R. bergii* an interesting model for intrapopulation analysis of sex chromosome evolution. Finally, considering that in neo-sex chromosomes of *R. bergii* the recombination was mostly suppressed at least since the large pericentric took place we document an example of differential accumulation/variability

of satDNA as a posterior force after suppression of recombination driving sex chromosome evolution.

References

- Bachtrog D (2013) Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews* 14:113-124
- Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank JE, McDaniel SF, Pires JC, Rice WR, Valenzuela N (2011) Are all sex chromosomes created equal? *Trends Genet* 27:350–357
- Bachtrog D, Mahajan S, Bracewell R (2019) Massive gene amplification of a recent formed *Drosophila* Y chromosome. *Nature Ecology and Evolution* 3:1587-1597
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, et al. (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol* 12(7) e1001899
- Benson G (1999) "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences". *Nucleic Acids Research* 27:573-580.
- Bidau CJ, Marti DA (2001) Meiosis and the Neo-XY system of *Dichroplus vittatus* (Melanoplinae, Acrididae): a comparison between sexes. *Genetica* 110(2):185-194
- Blackmon H, Demuth JP (2014) Estimating Tempo And Mode Of Y Chromosome Turnover: Explaining Y Chromosome Loss With The Fragile Y Hypothesis. *Genetics* 197:561-572
- Blackmon H, Demuth JP (2015) The Fragile Y Hypothesis: Y Chromosome Ane- Uploidy As A Selective Pressure In Sex Chromosome And Meiotic Mechanism Evolution. *Bioessays* 37:942-950
- Blackmon H, Ross L, Bachtrog D (2017) Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects. *J Hered* 108:78–93
- Cabral-de-Mello DC (2014) Protocols for cytogenetic mapping of arthropod genomes (Boca Raton, CRC Press) pp. 192-203
- Castillo ER, Marti DA, Bidau CJ (2010) Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. *J Orthoptera Res* 19:213–231.
- Castillo ER, Martí DA, Maronna MM, Scattolini MC, Cabral-de-Mello DC, Cigliano MM (2018) Chromosome evolution and phylogeny in *Ronderosia* (Orthoptera, Acrididae, Melanoplinae): clues of survivors to the challenge of sympatry? *Syst Entomol* 44:61-74
- Castillo ERD, Taffarel A, Marti DA (2014) The early evolutionary history of neo-sex chromosomes in Neotropical grasshoppers, *Boliviocris noroestensis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *European Journal Of Entomology* 111: 321-327
- Charlesworth D (2017) Evolution of recombination rates between sex chromosomes. *Phil Trans R Soc B* 372 :20160456

- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95:118–128
- Daish T and Grützner F (2019) Evolution and meiotic organization of heteromorphic sex chromosomes. *Curr Top Dev Biol* 134:1-48
- Ellegren, H (2011) Sex-chromosome evolution: recent progress and influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews* 12:157–166
- Ezaz T, Deakin JE (2014) Repetitive Sequence and Sex Chromosome Evolution in Vertebrates. *Advances in Evolutionary Biology* 2014:e104683
- Giovannotti M, Cerioni NP, Rojo V, Olmo E, Slimani T, Splendiani A, Barucchi VC (2018) Characterization of a satellite DNA in the genera *Lacerta* and *Timon* (Reptilia, Lacertidae) and its role in the differentiation of the W chromosome. *Exp Zool B Mol Dev Evol* 330:83-95
- Goll LG, Artoni RF, Gross MC, Mello LRA, Coelho MPB, Almeida MC, Schneider CH (2017) Comparative Cytogenetics of *Omophoita abbreviata* and *O. aequinoctialis* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticini) from the Adolpho Ducke Forest Reserve in Brazilian Amazonia: Intrapopulation Variation in Karyotypes. *Cytogenet Genome Res* 156:56-64
- Goubert C, Modolo L, Vieira C, ValienteMoro C, Mavingui P, Boulesteix M (2015) De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Genome Biol Evol* 7(4):1192–1205
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652
- Graves JAM (2008) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 42:565–86
- Hobza, R., Cegan, R., Jesionek, W., Kejnovsky, E., Vyskot, B., & Kubat, Z. (2017) Impact of Repetitive Elements on the Y Chromosome Formation in Plants. *Genes* 8(11) 302
- Li W, Challa GS, Zhu H, Wei W (2016) Recurrence of Chromosome Rearrangements and Reuse of DNA Breakpoints in the Evolution of the Triticeae Genomes. *G3* 6(12):3837-3847
- Lisachov AP, Makunin AI, Giovannotti M, Pereira JC, Druzhkova AS, Caputo Barucchi V, Ferguson-Smith MA, Trifonov VA (2019) Genetic Content of the Neo-Sex Chromosomes in *Ctenonotus* and *Norops* (Squamata, Dactyloidae) and Degeneration

- of the Y Chromosome as Revealed by High-Throughput Sequencing of Individual Chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 157:115-122
- Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. *Mol Biol Genet Lepidoptera*. 3:49–63.
- Matsunaga S (2009) Junk DNA promotes sex chromosome evolution. *Heredity* 102:525–526.
- Molnár I, Cifuentes M, Schneider A, Benavente E, Molnár-Lág M (2011) Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Ann Bot* 107:65-76
- Montiel EE, Cabrero, J, Camacho JPM, López-Loón MD (2012) Gypsy, RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. *Genetica* 140:365–374
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792–793
- Palacios-Gimenez OM, Castillo ER, Martí DA, Cabral-de-Mello DC (2013) Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evol Biol* 13:167
- Palacios-Gimenez OM, Dias GB, Lima LG, Kuhn GCS, Ramos É, Martins C, Cabral-de-Mello DC (2017) High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. *Sci Rep* 7:6422
- Palacios-Gimenez OM, Marti DA, Cabral-de-Mello DC (2015) Neo-sex chromosomes of *Ronderosia bergii*: insight into the evolution of sex chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma* 124:353–365
- Palacios-Gimenez OM, Milani, Lemos B, Castillo E R, Martí D A, Ramos E, Martins C, Cabral-de-Mello D C (2018) Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. *BMC Evolutionary Biology* 18:2
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:2934-2938.
- Raphael BJ (2012) Chapter 6: Structural Variation and Medical Genomics. *PLOS Computational Biology* 12:e1002821

- Rodríguez ME, Molina B, Merlo MA, Arias-Pérez A, Portela-Bens S, García-Angulo A, Cross I, Liehr T, Rebordinos L (2019) Evolution of the Proto Sex-Chromosome in *Solea senegalensis*. *Int J Mol Sci* 20(20):5111.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2016) High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* 6:28333
- Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos E, Nagoroto V, Ziemnczak K, et al. (2019) DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. *Chromosoma* 128(4):547-560
- Schmieder R, Edwards R (2011) Fast Identification and Removal of Sequence Contamination from Genomic and Metagenomic Datasets. *PLoS ONE* 6:e17288
- Skinner BM, Griffin DK (2012) Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity* 108:37-41
- Smit AFA, Hubley R, Green P (2017) RepeatMasker Open-4.0. Available at <http://www.repeatmasker.org>
- Steinemann S, Steinemann M (2005) Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 110:134-143
- Traut W, Sahara K, Marec F (2008) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1:332–346.
- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-RUano FJ et al. (2019) Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Sci Rep* 9:5856
- Valeri MP, Tomazella IM, Duarte JMB (2018) Intrapopulation Chromosomal Polymorphism in *Mazama gouazoubira* (Cetartiodactyla; Cervidae): The Emergence of a New Species? *Cytogenet Genome Res* 154:147-152
- Veltsos P, Keller I, Nichols RA (2008) The inexorable spread of a newly arisen neo-Y chromosome. *PLoS Genetics* e1000082
- Webb GC, White MJD, Contreras N, Cheney J (1978) Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. *Chromosoma* 67:309–339.
- Wright AE, Dean R, Zimmer F, Mank JE (2016) How to make a sex chromosome. *Nat Commun* 7:12087

Figures

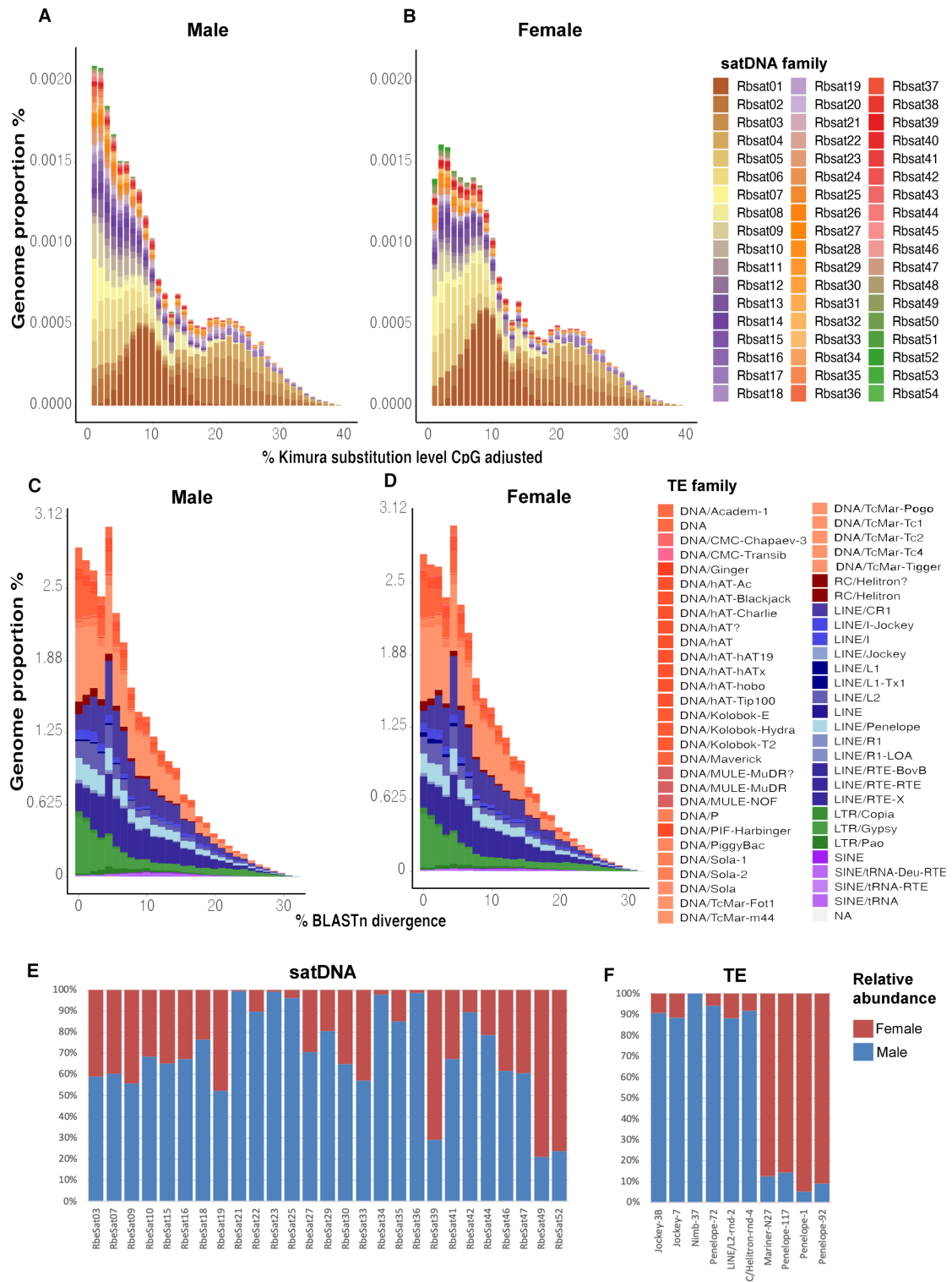


Figure 1. Repeat landscapes for the satDNA families of male (A) and female (B), and for TE families of male (C) and (D). Note the higher amplification of satDNA for male genome while for TEs there is almost none differences between the landscapes. Quantitative comparative repeat analysis between male and female genomes for (E) satDNAs families and (F) TEs subfamilies that were differentially amplified in one of the genomes. Each column represents 100% of the reads of a cluster with proportions in male (blue) and female (red) genomes.

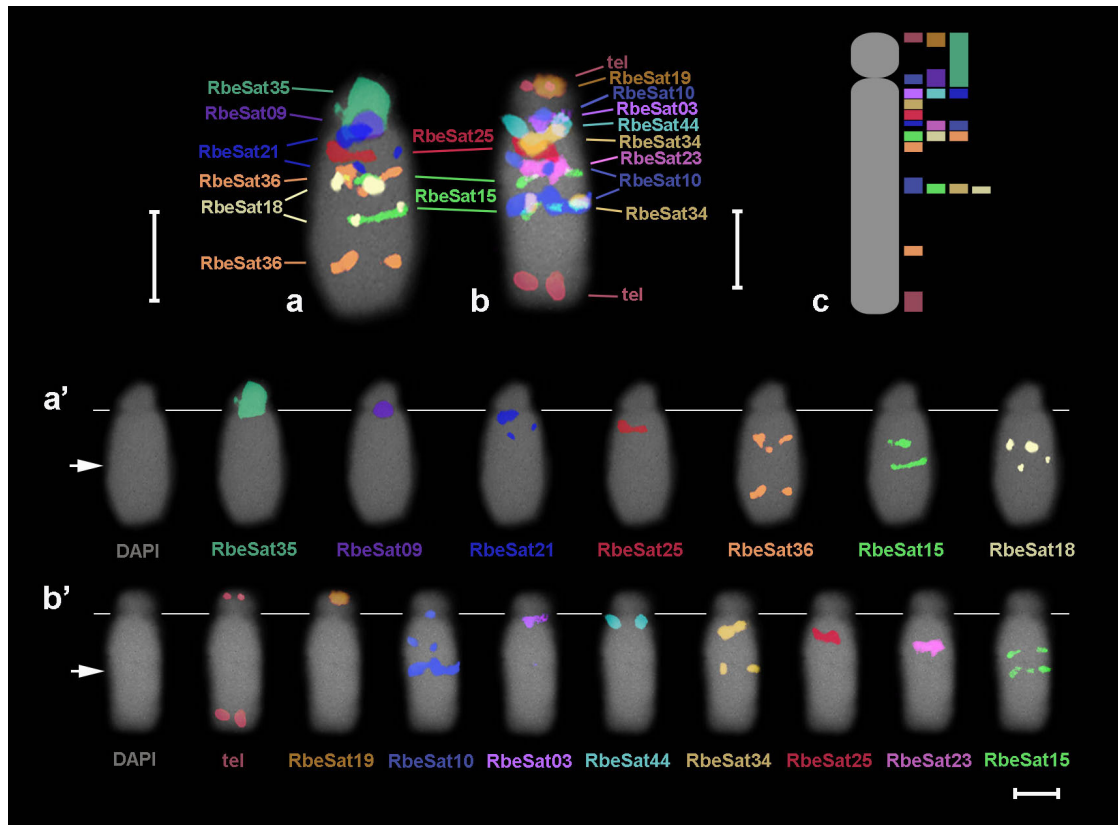


Figure 2. FISH mapping of 13 satDNAs and telomere probes on neo-Y chromosome. Each probe was pseudo-colored with the indicated colors (a, b) and in (c) the all probes were merged in an ideogram showing the relative position each other. The neo-Y chromosome in (a', b') is aligned by centromere and the arrow point to the middle part of long arm. As the FISH mapping was done in distinct neo-Y chromosome from the same embryo male the satDNAs RbeSat25 and RbeSat15 were used to anchor the two neo-Y and precisely define position of all FISH signals. This neo-Y chromosome represents the most common observed in the population. Bar=2.5 μm.

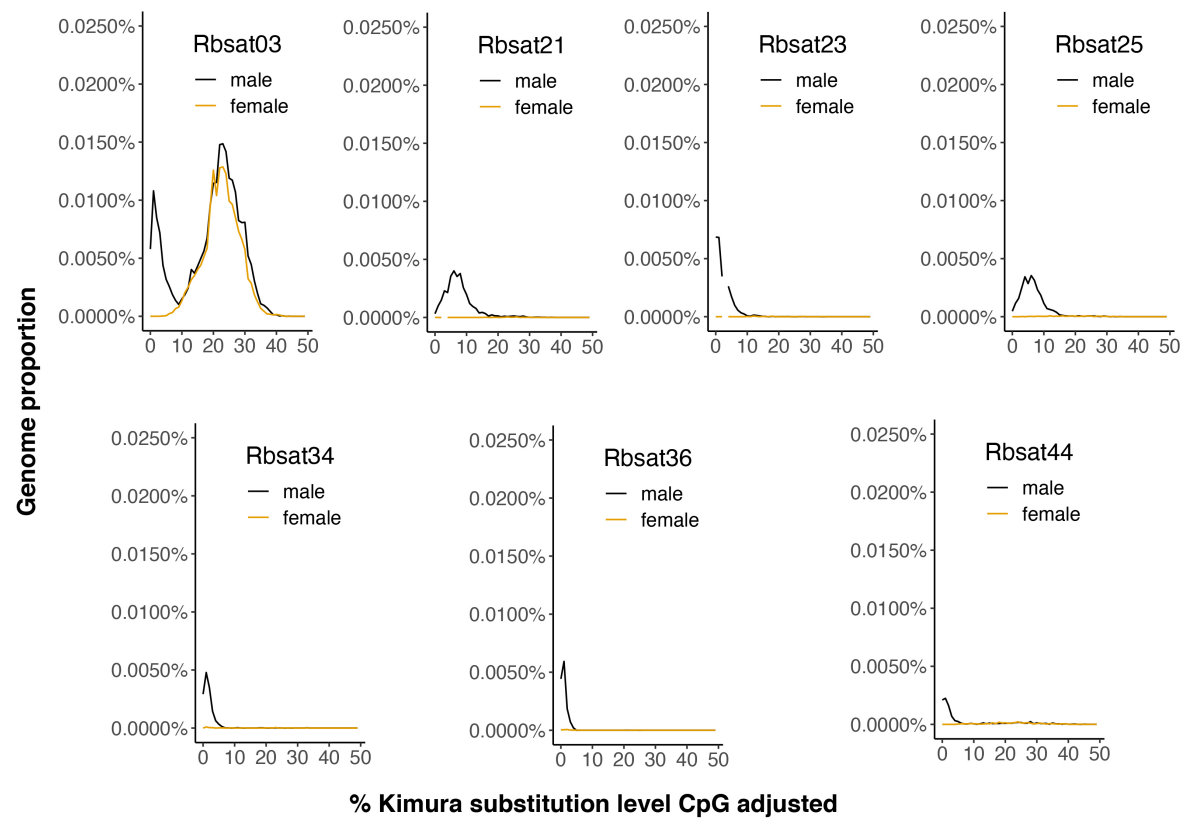


Figure 3. Each chart shows the abundance for each kimura index (K2P) for both genomes (male and female). Those were satDNAs located specifically on neo-Y chromosome by FISH mapping.

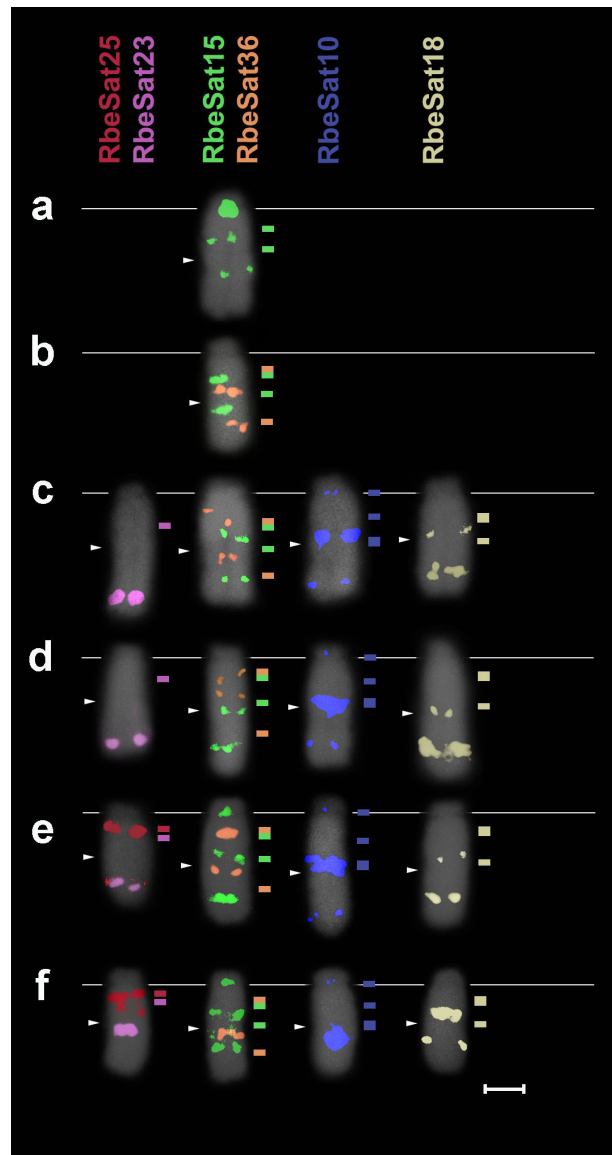


Figure 4. FISH mapping of satDNAs revealing variants of neo-Y chromosome of distinct male embryos (a-f). Colored squares next to each neo-Y chromosome indicates the location of the satDNA on the most common neo-Y variant (see figure). The neo-Y chromosomes are aligned by centromere and the arrowhead point to the middle part of long arm Bar = 2.5m

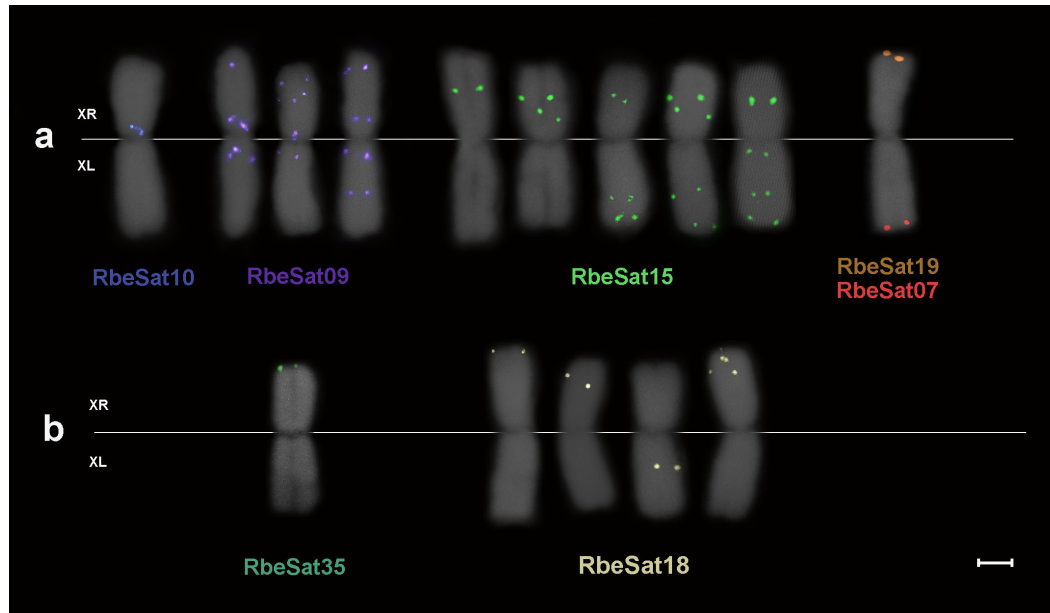


Figure 5. SatDNAs located on neo-X chromosome and its variants found on male embryos. In (a) satDNAs that presented signals on all embryos and in (b) satDNA that were present or absent. XL represents ancestral X chromosome and XR is the arm that shares homology with neo-Y. The neo-X chromosomes are aligned by centromere. Bar = 2.5μm

Tables

Table 1. Abundance and divergence of satDNAs recovered from six rounds of RepeatExplorer in male and female genomes. SF = superfamilies; V = number of variants; (*) signals that were present or absent, see results; (#) SatDNA families that were described by Palacios-Gimenez et al. 2018.

SF	SatDNA family	Length	A+T (%)	V	Abundance (%)		Divergence (%)		Signal		
					M	F	M	F	neo-Y	neo-X	A
1	RbeSat01-53#	53	58.50	7	0.3649	0.4308	9.89	9.86	Yes	Yes	Yes
	RbeSat02-609	609	52.38	1	0.3044	0.3011	17.31	16.89		-	
	RbeSat03-391	391	56.27	1	0.2352	0.1633	19.64	23.04	Yes	No	No
	RbeSat04-247	247	59.52	1	0.1760	0.1640	23.45	23.93		-	
	RbeSat05-297	297	60.27	1	0.1598	0.1921	4.81	4.65		-	
	RbeSat06-211	211	62.60	6	0.1424	0.1800	4.78	5.59		-	
	RbeSat07-277	277	63.90	1	0.1140	0.0752	2.32	2.41	No	Yes	Yes
	RbeSat08-11#	11	63.60	1	0.1015	0.0909	12.6	12.67	No	Yes	Yes
	RbeSat09-215	215.8	59.70	4	0.0979	0.0776	2.88	3.1	Yes	Yes*	Yes*
	RbeSat10-272	272.3	59.20	4	0.0918	0.0422	6.92	8.21	Yes	Yes*	Yes*
1	RbeSat11-98	98.2	52.30	6	0.0613	0.0680	8.8	8.78		-	
	RbeSat12-176#	176.4	56.80	7	0.0607	0.0179	4.25	5.34	Yes	Yes	Yes
	RbeSat13-214	214	63.10	2	0.0576	0.0710	6.38	6.1		-	
	RbeSat14-784	784	65.60	1	0.0565	0.0538	6.57	5.56		-	
	RbeSat15-288	288.7	56.40	3	0.0556	0.0297	6.7	7.19	Yes	Yes	Yes*
	RbeSat16-717	717	59.00	1	0.0553	0.0268	5.22	5.92	No	No	Yes
	RbeSat17-175	175	52.60	1	0.0548	0.0524	23.72	24.49		-	
	RbeSat18-239	239	58.60	4	0.0359	0.0111	7.71	9.45	Yes	Yes*	Yes
	RbeSat19-162	162	56.20	1	0.0358	0.0325	19.1	18.02	Yes	Yes	Yes*
	RbeSat20-212	212	66.50	1	0.0351	0.0341	7.95	8.5		-	
	RbeSat21-209	209	57.90	3	0.0322	0.0002	7.98	24.54	Yes	No	No
	RbeSat22-41	41	68.30	3	0.0306	0.0035	18.08	17.82	No	No	No
	RbeSat23-285#	285	55.80	2	0.0295	0.0002	2.44	18.06	Yes	No	No
	RbeSat24-227	227	62.60	2	0.0292	0.0335	6.91	6.55		-	
	RbeSat25-166#	166	59.00	5	0.0272	0.0011	6.87	19.11	Yes	No	No
	RbeSat26-141	141	79.40	2	0.0197	0.0181	13.48	13.97		-	
	RbeSat27-196	196	71.40	1	0.0196	0.0082	3.86	3.33	No	No	Yes
	RbeSat28-380	380	63.90	1	0.0187	0.0301	3.19	2.96		-	
	RbeSat29-21	21	52.40	1	0.0170	0.0041	18.44	6.85	No	No	Yes
	RbeSat30-188	188	55.30	1	0.0168	0.0090	10.22	16.58	No	No	No
	RbeSat31-123#	123	63.40	4	0.0157	0.0216	10.89	10.04	No	Yes	Yes
	RbeSat32-143	143	72.30	3	0.0148	0.0164	11.79	11.41		-	
	RbeSat33-95	95	67.40	1	0.0145	0.0109	8.42	8.17	No	No	No
	RbeSat34-312	312	59.00	1	0.0139	0.0003	1.75	10.61	Yes	No	No
	RbeSat35-374	374	60.40	1	0.0133	0.0023	3.43	11.83	Yes	Yes*	No
	RbeSat36-222	222	51.80	1	0.0131	0.0002	1.02	3.56	Yes	No	No
	RbeSat37-22#	22	54.50	1	0.0130	0.0235	9.79	8.94	No	No	Yes
	RbeSat38-328	328	68.00	1	0.0128	0.0125	6.37	6.27		-	
	RbeSat39-232	232	59.90	2	0.0128	0.0312	5.95	6.12	No	No	No
	RbeSat40-16#	16	56.20	1	0.0126	0.0092	11.03	11.68	No	Yes	Yes
	RbeSat41-90	90	55.60	1	0.0124	0.0060	9.76	13.91	No	No	No
	RbeSat42-124	124	63.70	3	0.0116	0.0014	9.99	14.13	No	No	No
	RbeSat43-415	415	61.70	1	0.0108	0.0117	15.17	14.88		-	
	RbeSat44-296	296	53.70	1	0.0101	0.0028	7.77	23.04	Yes	Yes*	Yes*
	RbeSat45-5#	5	60.00	1	0.0088	0.0108	11.6	10.81	No	Yes	Yes

RbeSat46-289	289	56.70	1	0.0081	0.0050	1.99	2.04	No	No	Yes
RbeSat47-231	231	64.90	1	0.0073	0.0047	3.16	4.44	No	No	No
RbeSat48-238	238	47.90	2	0.0063	0.0058	5.51	7.42		-	
RbeSat49-221	221	53.40	1	0.0049	0.0182	10.19	5.29	No	No	No
RbeSat50-379	379	55.90	1	0.0047	0.0071	2.98	2.98		-	
RbeSat51-37	37	51.40	1	0.0037	0.0041	10.96	10.68		-	
RbeSat52-176	176	54.50	1	0.0035	0.0114	1.12	1.43	No	No	Yes
RbeSat53-21	21	42.90	1	0.0022	0.0025	3.89	3.89		-	
RbeSat54-22#	22	36.40	1	0.000015	-	6.32		No	Yes	Yes

Supplementary material

SM 1. Primers used for amplification of repetitive DNAs used for FISH mapping.

Sequence name	Primer Forward	Primer Reverse
RbeSat03	TTCGCAATGCCTGCCCATG	GGTAAATGGTCTGCAAGATCG
RbeSat07	TGCTCCACATTTCACTCGTG	GTCAGTGCGTCTGAGAAAGA
RbeSat09	CCCTCTGCACGATGTAGTAT	CCCTCGTTGAGCAGATTTCA
RbeSat10	AGCTTAGCAGCTACCAGGC	ACTGGTTGATTCAAGTAACGC
RbeSat15	GCTTTGTGACCGTTACTGGA	GTGCAAAATCCGGTTTCCCT
RbeSat16	GTCTATGCCATGCTTATTTCT	TTACCCTATACACGACTTTCT
RbeSat18	TGAGGAGAGGCTAGTCTACA	CTCAGCGACCAGCAGCAG
RbeSat19	CGCGTCTCGATATCTCTACT	GTAAAAAGCGTTCGGTTGCA
RbeSat21	CGTGTATACAATGTTGCTCTC	TGAGGTGAGTGATCGATCAAT
RbeSat22	TACACATGCTATAAAAGCTTG	AGCATACTCTTATGCTTAAAC
RbeSat27	AGATTTGATGTTTGCACTGCTT	TGTTAGCACTCGAAATGTAAAC
RbeSat29	ATCTCCATACTGTCGCAGAC	TGTCTGCGACAGTATGGAGA
RbeSat30	ACAAGGACGTTGGGTTTCGTA	CCTGCGCCCTTAGATAACTA
RbeSat33	TAAATGCGATGTACAACCTAA	GTTACATTTCACTGACTTTA
RbeSat34	TCGAAGTACAGTCACAGATAC	GCTATATTCTTCAGTCGGTGT
RbeSat35	CCATTTCGTCGTCCTGGAT	AGTACGAGATGCTGTCTTCC
RbeSat36	AGCAGAGAAGCACGACGC	TGCGCGTTGTTGAGGTTAGA
RbeSat39	GCTACAGTGAGACTGAACTAA	CAGCATGTAGTCACCAGCTT
RbeSat41	TGCACTGGTCTAAGGCGTAT	CCATCTGCTAAGAGTGACAG
RbeSat42	GAACCAACAACCTAGTTCACTAA	ATTTGTAAATCCAATTGCAGCC
RbeSat44	CTCGCAGTACCCTTAGGTAA	CGGATCAACTTTCTAC
RbeSat46	GGAGCCAGAAGTAATCCACT	ACTGGAGAAAAGCAGTCCTG
RbeSat47	ATTGAGACTGTCAGGGAGTC	GCTATCTGCTGAAGGATCGT
RbeSat49	TTACAAGACCAGTGCTCTGC	ACCAGGGGTTGTGAGTTCTG
RbeSat52	GCTGGACCCAGAATCCAGT	AGTGCTCTCTGTCTCACTCA
Penelope-92	CGCAAGTGTATATAAAACGTAGACTGA	ACCAATTTTACATCGGACAACTGG
Mariner-N27	TTGAGCGCTTTCACGAAACA	GTTTCGTCTCACGTTCCGACA
Penelope-72	GTCATCCACGAATTGCACCG	TTCTGTCTGTGCTTGTCCCA
Jockey-3B	GCGGAGATGGAGAGTTGGAG	CCTCATCTCCGTTCCATCCG
Jockey-7	CCTGGAGGAGTGTGTAGGGA	ATCATCCCCACCCTCCTTGA
Penelope-117	GACAGGAGAGACCCACTTGC	CACGAGTGGCTGGCTTTTTC
Nimb-37	ATCGAGCTTTCGTCCGATCC	CTGTGTACACGACCGTCCAA
LINE/L2-rnd-2	GGAGGTGCTTCCCCATAGAA	TCCATTCTTGGCCCATTGCT
RC/Helitron-rnd-4	CATGTACCAGCAACAACCGC	TCACGCGCTATCAAGTTGGT
Penelope-1	CGTCATGAACTTGGAGAAAAGGT	AGCTGCAGTGGTATCACCTTT

SM 2. Abundance and divergence of TEs prospected on male and female genomes.

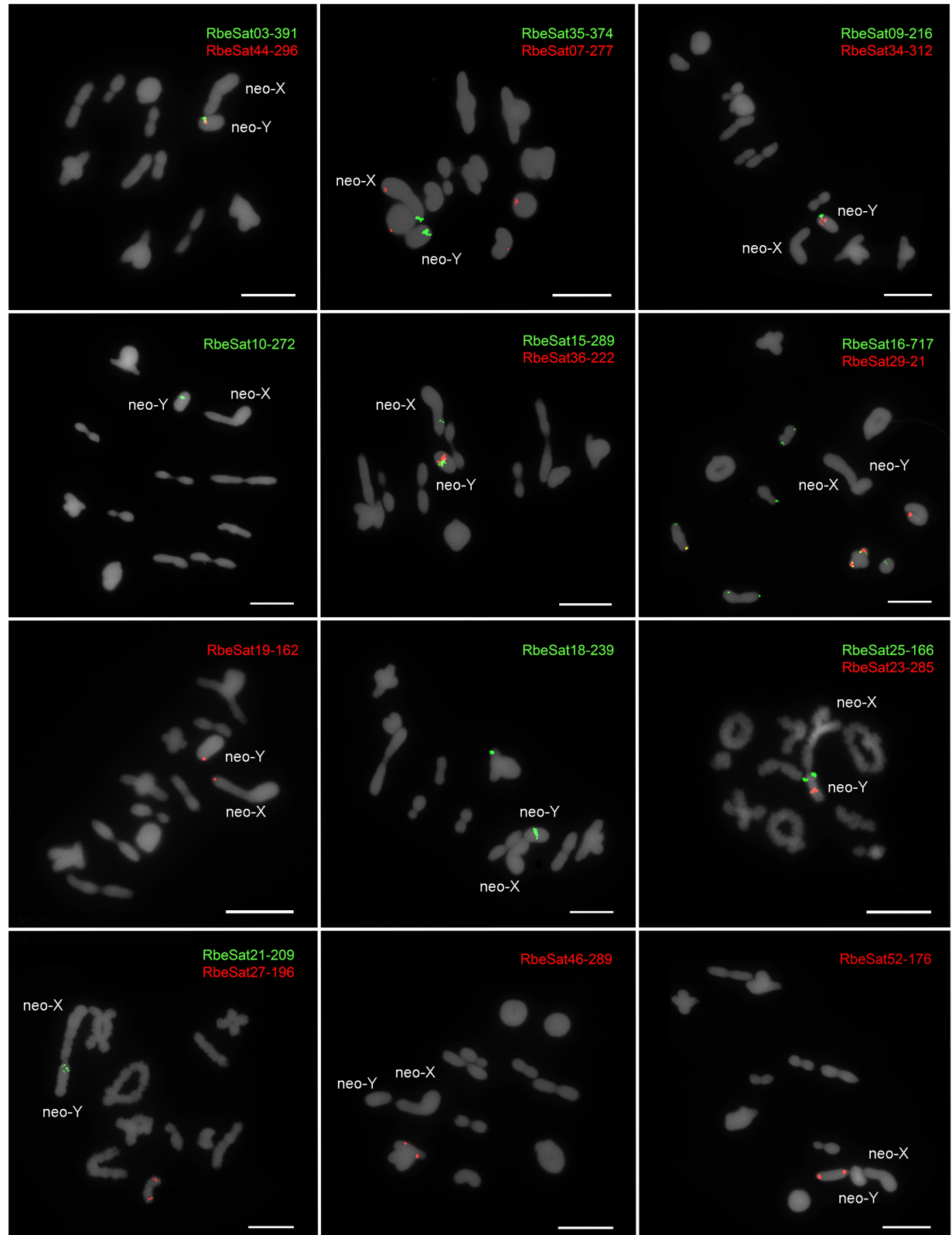
TE subclass/ family	Genome percentage (%)	
	Male	Female
DNA	1,95%	1,23%
Academ-1	0,12%	0,10%
CMC-Chapaev-3	0,23%	0,26%
CMC-Transib	0,03%	0,03%
Ginger	0,02%	0,03%
Kolobok-E	--	0,00%
Kolobok-Hydra	0,18%	0,12%
Kolobok-T2	0,00%	0,00%
MULE-MuDR	0,07%	0,03%
MULE-NOF	--	0,00%
Maverick	4,28%	4,88%
P	0,20%	0,20%
PIF-Harbinger	0,20%	0,24%
PiggyBac	0,60%	0,96%
Sola	0,03%	0,01%
Sola-1	0,25%	0,26%
Sola-2	1,27%	1,22%
TcMar	0,02%	0,00%
TcMar-Fot1	0,01%	0,01%
TcMar-Pogo	0,01%	0,02%
TcMar-Tc1	5,04%	4,97%
TcMar-Tc2	0,02%	0,03%
TcMar-Tc4	0,15%	0,23%
TcMar-Tigger	0,13%	0,14%
TcMar-m44	0,33%	0,33%
hAT	0,08%	0,07%
hAT-Ac	0,22%	0,17%
hAT-Blackjack	0,25%	0,20%
hAT-Charlie	0,45%	0,59%
hAT-Tip100	0,68%	0,79%
hAT-hAT19	0,02%	0,02%
hAT-hATx	--	0,01%
hAT-hobo	0,02%	0,01%
LINE	0,05%	--
CR1	2,82%	3,10%
I	0,86%	0,85%
I-Jockey	1,59%	1,96%
I-Nimb	0,04%	0,03%
Jockey	0,13%	0,08%
L1	0,01%	0,01%
L1-Tx1	0,72%	0,85%

	L2	3,41%	2,67%
	Penelope	5,23%	5,51%
	R1	0,30%	0,30%
	R1-LOA	1,31%	1,31%
	RTE-BovB	5,24%	5,09%
	RTE-RTE	0,05%	0,07%
	RTE-X	0,00%	0,01%
LTR		--	--
	Copia	1,34%	2,08%
	Gypsy	8,47%	8,15%
	Pao	0,22%	0,20%
RC		--	--
	Helitron	1,19%	0,99%
SINE		0,03%	0,04%
	tRNA	0,10%	0,17%
	tRNA-Deu-RTE	0,05%	0,06%
	tRNA-RTE	0,07%	0,09%
	Unknown	0,87%	0,89%

SM 3. TEs subfamilies that were differentially amplified in one of the genomes.

Subfamily TE	Genome proportion	
	Male	Female
Jockey-3B	0,10%	0,01%
Jockey-7	0,23%	0,03%
Nimb-37	0,16%	0,00%
Penelope-72	0,33%	0,02%
LINE/L2-rnd-2	0,15%	0,02%
RC/Helitron-rnd-4	0,23%	0,02%
Mariner-N27	0,01%	0,07%
Penelope-117	0,01%	0,06%
Penelope-1	0,02%	0,37%
Penelope-92	0,01%	0,10%

SM 4. FISH mapping of satDNAs that presented differential quantification in male or female genomes. SatDNAs that were not clustered (no signals) are not shown. Each satDNA is pseudocolored with indicated color directly in each panel. Bar = 10µm.



5. CONCLUSÕES FINAIS

Nossos dados dão suporte para uma grande diferenciação entre os neo-cromossomos sexuais de *R.bergii*, causado primariamente pela ação de DNAs satélites e eventos como inversões, amplificações e transposições. A extensiva participação dos DNAsat na evolução dos neo-cromossomos sexuais pode ser exemplificada pela presença de 21 famílias de DNAsat nesses cromossomos (totalizando 39% das famílias encontradas no genoma da espécie). Especificamente para o neo-Y, a amplificação de DNAsat é evidenciada por sua ocorrência ser 13,5% no genoma do macho do que da fêmea. Além disso, esse cromossomo apresenta sete famílias de DNAsat que estão localizadas exclusivamente nele, o que também contabiliza para sua diferenciação. As alterações causadas pelos DNAsats e rearranjos dos cromossomos sexuais nessa espécie causou o aparecimento de múltiplas variantes do neo-Y e neo-X em nível populacional, fazendo com que essa espécie seja um modelo interessante para análises intra-populacionais da evolução dos cromossomos sexuais. Finalmente, considerando que para os neo-cromossomos sexuais de *R.bergii* a recombinação foi, em sua maioria, suprimida desde a grande inversão paracentrica do cromossomo neo-Y, nesse trabalho foi possível documentar um exemplo de como o acúmulo e variabilidade diferencial de DNAsat pode agir como uma força dirigindo a evolução dos cromossomos sexuais após a supressão da recombinação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARKHIPOVA I. R. Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and understand their complex evolutionary histories. **Mob. DNA**, v. 8, 2017.

ARKHIPOVA, I.R. Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and understand their complex evolutionary histories. **Mob DNA**, v. 8, p. 1-14, 2017.

BACHTROG, D. Sex chromosome evolution: molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*. **Genome Research**, v. 15, n. 10, p. 1393-1401, 2005.

BACHTROG, D. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. **Nature Reviews**, v. 14, p. 113-124, 2013.

BACHTROG, D.; KIRKPATRICK, M.; MANK, J. E.; MCDANIEL, S. F.; PIRES, J. C.; RICE, W.; VALENZUELA, N. Are all sex chromosomes created equal?. **Trends in Genetics**, 27(9), 350-357. 2011.

BACHTROG, D.; MANK, J.E.; PEICHEL, C.L.; KIRKPATRICK, M.; OTTO, S.P.; et al. (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol* 12(7) e1001899

BECK, C.R.; GARCIA-PEREZ, J.L.; BADGE, R.M.; MORAN, J.V.; LINE-1 elements in structural variation and disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 12, p. 187–215, 2011.

BIDAU, C.J.; MARTI, D.A. Meiosis and the Neo-XY system of *Dichroplus vittatus* (Melanoplinae, Acrididae): a comparison between sexes. **Genetica**, v. 110, n. 2, p. 185-194, 2001.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 521-524, 2006.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J.P. The Fragile Y Hypothesis: Y Chromosome Ane- Uploidy As A Selective Pressure In Sex Chromosome And Meiotic Mechanism Evolution. **Bioessays**, v. 37, p. 942–950, 2015.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J.P. Estimating Tempo And Mode Of Y Chromosome Turnover: Explaining Y Chromosome Loss With The Fragile Y Hypothesis. **Genetics**, v. 197, p. 561–572, 2014.

BLACKMON, H.; ROSS, L.; BACHTROG, D. Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects. **J Hered**, v. 108, p. 78–93, 2017.

BOEKE, J.D.; GARFINKEL, D.J.; STYLES, C.A.; FINK, G.R. Ty elements transpose through an RNA intermediate. **Cell**, v. 40, p. 491–500, 1985

BOURQUE G., K. H. BURNS, M. GEHRING, V. GORBUNOVA, A. SELUANOV, et al., Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biol**, v. 19, p. 1-15, 2018.

BOURQUE, G.; BURNS, K.H.; GEHRING, M. GORBUNOVA, V.; SELUANOV, A.; HAMMELL, M.; et al. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biol**, v. 19, p. 1 – 12, 2018.

BRACEWELL, R.; CHATLA, K.; NALLEY, M.J.; BACHTROG, D. Dynamic turnover of centromeres drives karyotype evolution in *Drosophila*. **eLIFE**, v. 16, p. e49002, 2019.

BRAJKOVIĆ, J.; FELICIELLO, I.; BRUVO-MAĐARIĆ, B.; UGARKOVIĆ, Đ. Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. **G3. Genes, Genomes, Genet**, v.2, p. 931–941, 2012.

BROSSEAU, G.E. Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 45, p. 257–274, 1960.

BULL J.J. Sex determining mechanisms: An evolutionary perspective (Dept. of Zoology, University of Texas. *Experientia* 41, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland, 1985.

BULL, J.J. Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1983.

CABRAL-DE-MELLO, D.C. Protocols for cytogenetic mapping of arthropod genomes (Boca Raton, CRC Press) pp. 192-203, 2015.

CARVALHO, A.B. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 12, n. 6, p. 664-668, 2002.

CASTILLO, E.R.; MARTI, D.A.; BIDAÚ, C.J. Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. **Journal of Orthoptera Research**, v. 19, n. 2, p. 213-231, 2010.

CASTILLO, E.R.D.; TAFFAREL, A.; MARIOTTINI, Y.; FERNANDEZ-ARHEX, V.; MARTÍ, D.A.; BIDAÚ, C.J. Neo-sex chromosomes in the *Maculipennis* species group (*Dichroplus*: Acrididae, Melanoplinae): the cases of *D. maculipennis* and *D. vittigerum*. **Zoological Science**, v. 33, n. 3, p. 303-310, 2016.

CHANG, C.H.; CHAVAN, A.; PALLADINO, J.; WEI, X.; MARTINS, N.M.C.; SANTINELLO, B.; CHEN, C.C.; ERCEG, J.; BELIVEAU, B.J.; LARRACUENTE, A.M.; MELLONE, B.G. Islands of retroelements are major components of *Drosophila* centromeres. **PLoS Biol**, v. 14, p. e3000241, 2019.

CHARLESWORTH B. The Evolution of Sex and Recombination. **TREE**, v. 4, p 264 - 267, 1989.

CHARLESWORTH D. Evolution of recombination rates between sex chromosomes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 372, p 1-8, 2017.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215, 1994.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B., MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.

CHENG, Z.; DONG, F.; LANGDON, T.; OUYANG, S.; BUELL, C.R.; GU, M.; BLATTNER, F.R.; JIANG, J. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. **Plant Cell**, v. 14, p. 1691-1704, 2002.

DAISH, T.; GRÜTZNER, F. Evolution and meiotic organization of heteromorphic sex chromosomes. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 134, p. 1-48, 2019.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews**, v. 12, p. 157 – 166, 2011.

EZAZ, T.; DEAKIN, J.E. Repetitive Sequence and Sex Chromosome Evolution in Vertebrates. **Advances in Evolutionary Biology**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

FELICIELLO, I.; AKRAP, I.; UGARKOVIĆ, D. Satellite DNA modulates gene expression in the beetle *Tribolium castaneum* after heat stress. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 8, p. e1005547, 2015.

FERREIRA, A.; CELLA, D.M. Chromosome structure of *Eneoptera surinamensis* (Orthoptera, Grylloidea, Eneopterinae) as revealed by C, NOR and N banding techniques. **Chromosome Science**, v. 9, n. 2, p. 47-51, 2006.

FERREIRA, A.; MESA, A. Cytotaxonomy of the genus *Dichromatos* Cigliano 2007 (Orthoptera, Acridoidea, Melanoplinae). **Journal of Orthoptera Research**, v. 19, n. 2, p. 233-237, 2010.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368, 2007.

FESCHOTTE, C.; WESSLER, S.R. Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 280-285, 2002.

GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 1-41, 2017.

GOODIER, J.L.; KAZAZIAN, H.H. Retrotransposons revisited: the restraint and

rehabilitation of parasites. **Cell**, v. 135, p. 23–35, 2008.

GOUBERT, C.; MODOLO, L.; VIEIRA, C.; VALIENTEMORO, C.; MAVINGUI, P.; BOULESTEIX, M. De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Genome Biol Evol**, v.7, p. 1192–1205. 2015.

GRABHERR, M.G.; HAAS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I ADICONIS, X.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol**, v. 29, p. 644–652, 2011.

GRAVES, J.A.M. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 565-586, 2008.

GREWAL, S.I.; ELGIN, S.C. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. **Nature**, v. 447, n. 339-406, p. 399-406, 2007.

HECKMANN, S.; MACAS, J.; KUMKE, K.; FUCHS, J.; SCHUBERT, V.; NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; TAUDIEN, S.; PLATZER, M.; HOUBEN, A. The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. **Plant Journal**, v 73, p. 555–565, 2013.

HEWITT, G.H. Orthoptera. Grasshoppers and Crickets. In: Animal Cytogenetics 3. Insecta 1, (Eds) by B. John. Gerbrüder Borntraeger: Berlin-Suttgart, pp 1-170. 1979.

HOBZA, R.; CEGAN, R.; JESIONEK, W.; KEJNOVSKY, E.; VYSKOT, B.; KUBAT, Z. Impact of Repetitive Elements on the Y Chromosome Formation in Plants. **Genes**, v. 8, p.1-10, 2017.

HUGHES-SCHRADER, S.B. Reversion of X0 to XY sex chromosome mechanism in a phasmid. **Chromosoma**, v. 3, p. 57–65, 1947.

JETYBAYEV, I.Y.; BUGROV, A.G.; UNAL, M.; BULEU, O.G.; RUBTSOV, N.B. Molecular cytogenetic analysis reveals the existence of two independent neo-XY sex chromosome systems in Anatolian Pamphagidae grasshoppers. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p. 1-12, 2017.

Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature*. 2004;431:569–73.

JIN, W.; MELO, J.R.; NAGAKI, K.; TALBERT, P.B.; HENIKOFF, S.; DAWE, R.K.; JIANG, J. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. **Plant Cell**, v. 16, p. 571-581, 2004.

JOHN, B.; MIKLOS, G.L. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin.

International Review of Cytology, New York: Academic Press, v. 58, pp. 1-114, 1979.

KEJNOVSKY, E. MICHALOVOVA, M.; STEFLOVA, P.; KEJNOVSKA, I.; MANZANO, S.; HOBZA R.; KUBA, Z.; KOVARIK, J.; JAMILENA, M.; VYSKOT, B. Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e45519, 2013.

KHOST, D. E.; EICKBUSH, D. G.; LARRACUENTE, A. M. Single-molecule sequencing resolves the detailed structure of complex satellite DNA loci in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 27, p. 709–721, 2017.

KRAMEROV, D.A.; VASSETZKY, N.S. Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. **Heredity**, v. 107, n. 6, p. 487-495, 2011.

LARRACUENTE, A. M. The organization and evolution of the Responder satellite in species of the *Drosophila melanogaster* group: dynamic evolution of a target of meiotic drive. **BMC Evol. Biol**, v. 14 p. 1-14, 2014.

LEE, H. R.; NEUMANN, P.; MACAS, J.; JIANG, J. Transcription and evolutionary dynamics of the centromeric satellite repeat CentO in rice. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 2505–2520, 2006.

LEPESANT, J.M.J.; COSSEAU, C.; BOISSIER, J. Chromatin structural changes around satellite repeats on the female sex chromosome in *Schistosoma mansoni* and their possible role in sex chromosome emergence. **Genome Biology**, v. 13, p. 1-15, 2012.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. Repetitive DNA in the Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes (ed. Garrido- Ramos, M.A.) p. 1-28 (Genome Dyn. Basel, Karger, vol 7. 2012.

MAREC. F.; SAHARA, K.; TRAUT, W. Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. **Mol Biol Genet Lepidoptera**, v. 3, p. 49–63, 2010.

MARIOTTI, B.; MANZANO, S.; KEJNOVSKY, E.; VYSKOT, B.; JAMILENA M. Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281 p. 294-259, 2008.

MATSUNAGA, S. Junk DNA promotes sex chromosome evolution. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 525-526, 2009.

MESA, A.; FONTANETTI, C.S.; GARCÍA-NOVO, P. Does an X-autosome centric fusion in Acridoidea condemn the species to extinction? **Journal of Orthoptera Research**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2001.

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. 1-15, 2018.

NAGAKI, K.; SONG, J.; STUPAR, R.M.; PAROKONNY, A.S.; YUAN, Q.; OUYANG, S.; JIANG, J. Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. **Genetics**, v. 163, p. 759–770, 2003

OHNO, S. Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. Springer-Berlin, v. 1, 1967.

PAÇO, A.; ADEGA, F.; MEŠTROVIĆ, N.; PLOHL, M.; CHAVES, R. The puzzling character of repetitive DNA in Phodopus genomes (Cricetidae, Rodentia). **Chromosome Res**, v. 23, p. 427–440, 2015.

PAÇO, A.; CHAVES, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A.; ADEGA, F. The involvement of repetitive sequences in the remodelling of karyotypes: the Phodopus genomes (Rodentia, Cricetidae). **Micron**, v. 46, p. 27-34, 2012.

PAÇO, A.; FREITAS, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A. Conversion of DNA Sequences: From a Transposable Element to a Tandem Repeat or to a Gene. **Genes**, v. 10, p. 1-15, 2019.

PAÇO, A.; FREITAS, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A. Conversion of DNA Sequences: From a Transposable Element to a Tandem Repeat or to a Gene. **Genes**, v. 10, p. 1- 15, 2019.

PAL-BHADRA, M.; LEIBOVITCH, B.A.; GANDHI, S.G.; CHIKKA, M.R.; BHADRA, U.; BIRCHLER, J.A.; et al. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 669-672, 2004.

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**, v.25, p. 137 – 147, 2017,a.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. Mol. Genet. **Genomics**, v. 290, p. 623–631, 2015,a.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; DIAS, G. B.; DE LIMA, L. G.; CAMPOS, G.; KUHN, S.; RAMOS, E.; 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, n. 1, p. 6422, 2017,b.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 167, 2013.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; MARTI, D.A; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Neo-sex chromosomes of *Ronderosia bergi*: insight into the evolution of sex chromosomes in grasshoppers. **Chromosoma**, v. 124, n. 3, p. 353-365, 2015,b.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; MILANI, D.; LEMOS, B.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; RAMOS, E.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v.18, p. 1 – 15, 2018.

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564-573, 2008.

PAVLEK, M.; GELFAND, Y.; PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N. Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. **Dna Res**, v.22, p. 387–401, 2015.

PITA, S.; PANZERA, F.; MORA, P.; VELA, J.; CUADRADO, Á.; SÁNCHEZ, A.; PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. **PLoS ONE** 12(7): e0181635, 2017.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1-2, p. 72-82, 2008.

RUIZ-RUANO, F. J.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, p. 487-500, 2017.

RUIZ-RUANO, F. J.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; SÁNCHEZ, A.; CAMACHO, J. P. M. Quantitative sequence characterization for repetitive DNA content in the supernumerary chromosome of the migratory locust. **Chromosoma**, v. 127, p. 45-57, 2018b.

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

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**, v. 123, p. 587–599, 2019.

RUIZ-RUANO, F.J., LÓPEZ-LEÓN, M.D., CABRERO, J. and CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, p. 28333, 2016.

SCHEMBERGER, M.O.; NASCIMENTO, V.D.; COAN, R.; RAMOS, E.; NOGAROTO, V.; ZIEMNICZAK, K.; VALENTE, G.T.; MOREIRA-FILHO, O.; MARTINS, C.; VICARI, M.R. DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, v.128, p.547-560, 2019.

SCHMID, M. Evolution of sex chromosomes and heterogametic systems in Amphibia. *Differentiation* 23, Suppl:S13-22., 1983

SCHNABLE, P. S.; WARE, D.; FULTON, R. S.; STEIN, J. C.; WEI, F.; PASTERNAK, S.; WILSON, R. K. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, p. 1112–1115, 2009.

SERRANO-FREITAS, É.A.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J.P.M.; FORESTI, F. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Mol Genet Genomics**, v. 295 p. 195–207, 2020.

SERRATO-CAPUCHINA, A.; MATUTE, D. R. The role of transposable elements in speciation. **Genes**, v. 9, p. e254, 2018.

SILVA, B.S.M.L.; HERINGER, P.; DIAS, G.B.; SVARTMAN, M.; KUHN, G.C.S. De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of *Drosophila virilis* and *D. americana* using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. **PLoS ONE**, v. 14, p. e0223466, 2019.

SILVA, D.M.Z.A.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F.J.; DANIEL, S.N.; PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J.P.M.; FORESTI F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

SMIT, A.F.A.; HUBLEY, R., GREEN, P. RepeatMasker Open-4.0, 2017, Available at <http://www.repeatmasker.org>.

SPROUL, J.S.; KHOST, D.E.; EICKBUSH, D.S.; NEGM, S.; WEI, X.; WONG, I.; LARRACUENTE, M.A. Dynamic evolution of euchromatic satellites on the X chromosome in *Drosophila melanogaster* and the *simulans* clade. bioRxiv 846238; doi: <https://doi.org/10.1101/846238>

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 134-143, 2005.

TRAUT, W.; SAHARA, K.; MAREC, F. Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. **Sex Dev**, v.1, p. 332–346, 2007.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **EMBO J**, v. 21, p. 5955-5959, 2002.

USAKIN, L.; ABAD, J.; VAGIN, V.V.; PABLOS, B.; VILLASANTE, A.; GVOZDEV, V.A.; Transcription of the 1.688 satellite DNA family is under the control of RNA interference machinery in *Drosophila melanogaster* ovaries. **Genetics**, v. 176, p. 1343–1349, 2007.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; RUIZ-RUANO, F.J.; GOES, C.A.G.; MELO, S.; RAMOS, L.P.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Sci Rep**, v. 9, p. 1-10, 2019.

VELA, D.; FONTDEVILA, A.; VIEIRA, C.; GARCÍA-GUERREIRO, M.P.; Aggenome-wide survey of genetic instability by transposition in *Drosophila* hybrids. **PLoS One**, v.9, p. e88992, 2014.

VELTSOS, P.; KELLER, I.; NICHOLS, R.A. The inexorable spread of a newly arisen neo-Y chromosome. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 5, p. e1000082, 2008.

VITTE, C.; BENNETZEN, J.L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17638-43, 2006.

VOLPE, T.A.; KIDNER, C.; HALL, I.M.; TENG, G.; GREWAL, S.I.; MARTIENSSEN, R.A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1833-1837, 2002.

WARCZALOWSKA-ŚLIWA E. Karyotype characteristics of katydid Orthopterans (Ensifera, Tettigoniidae) and remarks on their evolution at different taxonomic levels. **Folia Biol**, v.46, p. 143–176, 1988.

WEBB, G.C.; WHITE, M.J.D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J (1978). Cytogenetics of the parthogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. **Chromosoma**, v. 67, n. 4, p. 309-339, 1978.

WEILGUNY, L.; KOFLER. DeviaTE: Assembly-free analyses and visualization of mobile genetic element composition. **Molecular Ecology Resources**, v. 19, p. 1346-1354, 2019.

WHITE, M.J.D. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1973.

WHITE, M.J.D. The evolution of the sex chromosomes I. The X0 and X1X2Y mechanisms in praying mantids. **J Genet**, v. 42, p. 143–172, 1941.

WICKER T.; SABOT F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHAL-HOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; et al. A unified classification system for eukaryotic transposable 73 elements. **Nature Review Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

WITHERSPOON, D.J; ROBERTSON, H.M. Neutral evolution of ten types of *mariner* transposons in the genomes of *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, n. 6, p. 751-769, 2003.

WRIGHT, A. E.; DEAN, R.; ZIMMER, F.; MARK, J. E. How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, p. 12087, 2016.

ZEFA, E. Autosomal rearrangement in *Gryllus assimilis* Fabricius, 1775 (Orthoptera, Gryllidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 122, n. 3, p. 333-336, 1999.

ZHANG, Y.; HUANG Y, ZHANG L, LI Y, LU T, LU Y, FENG Q, ZHAO Q, CHENG Z, XUE Y, WING RA, HAN B. Structural features of the rice chromosome 4 centromere. *Nucleic Acids Res.* 2004 Apr 2;32(6):2023-30. doi: 10.1093/nar/gkh521. PMID: 15064362; PMCID: PMC390372.

ZHONG, C.X.; MARSHALL, J.B.; TOPP, C.; MROCZEK, R.; KATO, A.; BIRCHLER, J.A.; DAWE, R.K. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. **Plant Cell**, v. 14, p. 2825–2836, 2014.