



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MOARA RODRIGUES COSTA

**CARACTERIZAÇÃO E DINÂMICA EVOLUTIVA DO SATELITOMA DE  
*Dichotomius schiffleri* (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) E MAPEAMENTO  
CROMOSSÔMICO DE DNAsat EM ESPÉCIES DO GRUPO *D. sericeus***

Recife

2018

MOARA RODRIGUES COSTA

**CARACTERIZAÇÃO E DINÂMICA EVOLUTIVA DO SATELITOMA DE  
*Dichotomius schiffleri* (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) E MAPEAMENTO  
CROMOSSÔMICO DE DNAsat EM ESPÉCIES DO GRUPO *D. sericeus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Área de concentração:** Genética Animal

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia de Moura

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Costa, Moara Rodrigues

Caracterização e dinâmica evolutiva do satelitoma de *Dichotomius schiffleri* (coleoptera: scarabaeidae) e mapeamento cromossômico de DNAsat em espécies do grupo *D. sericeus* / Moara Rodrigues Costa Silva - 2018.

50 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rita de Cássia de Moura

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.  
Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. *Dichotomius schiffleri* 2. Mapeamento heterólogo 3.  
Heterocromatina constitutiva I. Moura, Rita de Cássia de II. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-428

**Moara Rodrigues Costa**

**CARACTERIZAÇÃO E DINÂMICA EVOLUTIVA DO  
SATELITOMA DE *Dichotomius schiffleri* (COLEOPTERA:  
SCARABAEIDAE) E MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE  
DNAsat EM ESPÉCIES DO GRUPO *D. sericeus***

Aprovado em 13/08/2018

**Banca Examinadora**

---

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia de Moura**  
**Universidade de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup> Vilma Loreto da Silva**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr Martín Alejandro Montes**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup> Neide Santos**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife, 2018**

*À minha mãe, Elizangela Rodrigues da Silva e  
orientadora, Rita de Cássia de Moura, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Os últimos dois anos e meio de mestrado acadêmico representam pra mim, até o momento, o maior desafio da minha vida. Conciliar a pesquisa com questões pessoais foi árduo, e muitas vezes pensei em desistir. Devo este trabalho a algumas pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, me incentivaram e tornaram a conclusão deste ciclo possível.

Primeiro, agradeço imensamente à minha mãe, Elizangela Rodrigues e à minha avó, Risomar Rodrigues, por todo amor, paciência e investimento durante todos esses anos de vida. Tudo que alcancei devo e dedico à vocês.

À minha orientadora, Rita Moura, que devo a maior parte da minha formação. Serei eternamente grata por seus ensinamentos, disponibilidade, amizade e principalmente por ter acreditado em mim quando nem eu mesmo acreditava.

Aos meus colegas do Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos do ICB/UPE pela parceria no ambiente de trabalho, em especial Geyner Alves, Igor Amorim e Crislaine Xavier, pela dedicação no presente estudo. Sem a contribuição de vocês nada disso seria possível. Obrigada.

À minha “miga”, para além do ambiente de laboratório, Rafaelle Costa, pela amizade durante esses anos, por todos os momentos de descontração, troca de conhecimentos, apoio, e claro, pelos puxões de orelha quando necessário (rs).

Aos meus amigos-irmãos, Augusto Ferraz e Erik Almeida, que estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigada por todas as palavras de conforto, paciência e pelas brincadeiras, que tanto me ajudaram ao longo deste processo.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (ICB/UPE) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela estrutura e fomento durante meu projeto de mestrado. Além disso, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro destinado ao LBG/ICB/UPE.

Gratidão.

Nada tão duro que não possa dizer: Posso!

(LEMINSKI, 2017, p. 41).

## RESUMO

Os DNAs satélites (DNAsat) – sequências altamente repetidas *in tandem* – apresentam rápida dinâmica evolutiva e correspondem ao principal componente da heterocromatina constitutiva (HC). Neste estudo foi realizada a caracterização e mapeamento cromossômico de DNAsat em *D. schiffleri*, visando analisar a organização e distribuição dessas sequências em cromossomos meióticos. Adicionalmente, o mapeamento heterólogo dos dois DNAsat mais abundantes no genoma de *D. schiffleri* foi realizado, no intuito de investigar a ocorrência dessas sequências nos cariótipos de espécies do grupo *D. sericeus*. O satelitoma foi sequenciado na plataforma Illumina Hiseq2000. Os DNAsat foram identificados no *RepeatExplorer* e caracterizados no *Geneious* 4.5.8. A HC foi localizada por bandeamento C e o mapeamento cromossômico dos DNAsat por hibridização *in situ* fluorescente. Em *D. schiffleri* foram identificadas 26 famílias DNAsat distribuídas em quatro superfamílias (SF), sendo a SF01 a mais diversa e abundante. Essas famílias demonstraram variação no tamanho dos monômeros e a maior riqueza em AT descrita em DNAsat identificados em Coleoptera. Além disso, o mapeamento cromossômico demonstrou que esses DNAsat são abundantes em regiões pericentroméricas, ricas em HC, demonstrando um eficaz processo de equilocidade da heterocromatina e sugerindo o papel dessas sequências no cariótipo da espécie. Apenas uma família sofreu intersticialização, estando localizada na eucromatina. A hibridização heteróloga das duas famílias mais abundantes em outras espécies do grupo *D. sericeus* revelaram ancestralidade comum e variação interespecífica na localização dessas sequências. Esses dados representam a primeira descrição do DNAsat em Scarabaeidae e sugere o papel dessas sequências na manutenção da arquitetura da HC em *D. schiffleri*.

**Palavras-chave:** Besouro rola-bosta. Mapeamento heterólogo. Heterocromatina constitutiva. Hibridização *in situ* Fluorescente.



## ABSTRACT

The satellite DNA (satDNA) – highly repetitive sequences *in tandem* – presents rapid evolutionary dynamics and it is the major component of constitutive heterochromatin (CH). In this study, the characterization and chromosomal mapping of satDNA was performed in *D. schiffleri*, aiming to analyze the organization and distribution of these sequences and their relation with the variation observed in the HC of this genus. Additionally, the heterologous mapping of the two most abundant satDNA families was performed in order to investigate the conservation of these sequences in *sericeus* group. The satDNA was sequenced on the Illumina HiSeq2000 platform. DNAsat were identified in RepeatExplorer and characterized in Geneious 4.5.8. The CH was localized by C-banding and chromosome mapping by fluorescence *in situ* hybridization. In *D. schiffleri*, 26 satDNA families were found distributed in four superfamilies (SFs), with SF01 being the most diverse and abundant. These families showed great variation of the monomers size and the largest richness of AT described in Coleoptera. In addition, chromosomal mapping demonstrated that satDNA are abundant in region with richness for CH pericentromeric regions, demonstrating an efficient equilocality of heterochromatin process and suggesting the role of these sequences in the karyotype of *D. schiffleri*. Only one family suffered interstitialization, being located in euchromatin. The heterologous hybridization of two most abundant families revealed common ancestry and interspecific variation in the location of these sequences. These data represent the first description of satDNA in Scarabaeidae and suggest the role of these sequences in the maintenance of CH architecture in *D. schiffleri*.

**Key words:** Dung beetle. Heterologous mapping. Heterochromatin constitutive. Fluorescence *in situ* hybridization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Classificação dos diferentes tipos de sequências de DNAs repetitivos encontrados nos genomas eucariontes. Fonte: Garrido-Ramos.....17
- Figura 2** - Tamanho total e abundância das sequências satélites em eucariontes. Em cada categoria (Microsatélites, Minissatélites e Satélites) o tamanho total e o número de ocorrência no genoma estão apresentados em escala logarítmica. Fonte: Richard et al.(2008).....18
- Figura 3** - Representação esquemática da evolução em concerto, onde uma mutação ocorrente na espécie ancestral 1 (setas azuis) sofre homogeneização e fixação, com posterior isolamento reprodutivo e especiação na espécie 2 (setas verdes) e 3 (setas laranjas). Fonte: Plohl et al.(2012) .....20
- Figura 4** - Representação esquemática da hipótese de biblioteca, no qual o genoma ancestral possui um pool de três diferentes famílias DNAsat (setas coloridas) que são diferencialmente amplificados nas espécies descendentes. Fonte: Plohl (2012).....21
- Figura 5** - Exemplar da espécie *Dichotomius schiffleri*. Fonte: Valois et al., 2017...25
- Figura 6** - Mapa de Pernambuco. Município de Ipojuca em azul, Jaboatão dos Guararapes em verde e Jurema em vermelho. Fonte: Google Maps.....27
- Figura 7** - Bandejamento C (A) e mapeamento cromossômico de diferentes famílias DNAsat em metáfases I de *Dichotomius schiffleri* (B-I) DscSat01-224 (B), DscSat02-170 (C), DscSat03-30 (D), DscSat04-148 (E), DscSat05-38 (F), DscSat07-76 (G), DscSat09-28 (H) e DscSat10-22 (I). Os números indicam os bivalentes autossômicos sem marcação. Bar = 5µm.....34
- Figura 8** - Mapeamento cromossômico de diferentes famílias DNAsat em metáfases I de *Dichotomius schiffleri*. DscSat14-19 (A), DscSat15-22 em (B), DscSat16-57 (C), DscSat17-41 (D), DscSat18-22 (E), DscSat20-21 (F) e DscSat21-33 (G). Bar = 5µm.....35
- Figura 9** - Mapeamento heterólogo das duas famílias mais abundantes de *Dichotomius schiffleri* em espécies do grupo *D. sericeus*. DscSat01-224 em *D. gilletti* (A), *D. guaribensis* (B), *D. iannuzziae* (C) e DscSat02-170 em *D. gilletti* (D) e *D. guaribensis* (E). Bar = 5µm.....35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização do satelitoma de *Dichotomius schiffleri*. Cluster (CL), superfamília (SF), família DNAsat, tamanho do monômero (TM), conteúdo em AT (%), número de variantes (V), densidade e abundância relativa de todos os DNAsat identificados no genoma de *D. schiffleri*. Em cada família, o tamanho dos monômeros e o conteúdo em AT é indicado para a variante mais abundante..... 31
- Tabela 2** - Mapeamento cromossômico de DNAsat em *Dichotomius schiffleri*. Família DNAsat, tamanho do monômero (TM) e localização cromossômica de famílias DNAsat (p = pericentromérica; i = intersticial; + = presente; - = ausente).....33

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| μ                 | Micrômetro                                            |
| μL                | Microlitro                                            |
| AgNO <sub>3</sub> | Nitrato de prata                                      |
| CIA               | Clorofórmio: Álcool Isoamílico                        |
| CMA <sub>3</sub>  | Cromomicina A3                                        |
| DA                | Distamicina                                           |
| DAPI              | 4-6-diamidino-2-fenil-indol                           |
| dATP              | Trifosfato de desoxiadenosina                         |
| DNAr              | DNA ribossomal                                        |
| DNAsat            | DNA satélite                                          |
| dUTP              | Trifosfato de desoxiuridina                           |
| FISH              | Hibridização <i>in situ</i> fluorescente              |
| FITC              | Isotiocianato de fluoresceína                         |
| h                 | Hora                                                  |
| HC                | Heterocromatina Constitutiva                          |
| HOR               | <i>Higher Order Repeat</i>                            |
| ICB               | Instituto de Ciências Biológicas                      |
| IUCN              | União Internacional para a Conservação da Natureza    |
| Kb                | Quilobases                                            |
| LBGI              | Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos   |
| min               | Minutos                                               |
| pb                | Pares de bases                                        |
| PCR               | Reação em Cadeia da Polimerase                        |
| PE                | Pernambuco                                            |
| RPPN              | Reserva particular do patrimônio natural              |
| s                 | Segundos                                              |
| SFs               | Superfamílias                                         |
| SISBIO            | Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade |
| TEs               | Elementos de transposição                             |
| UFPE              | Universidade Federal de Pernambuco                    |
| UPE               | Universidade de Pernambuco                            |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                      | 14 |
| 1.1      | OBJETIVOS                                                                                                              | 15 |
| 1.1.1    | Objetivo geral                                                                                                         | 15 |
| 1.1.2    | Objetivos específicos                                                                                                  | 15 |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                           | 16 |
| 2.1      | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O DNA SATÉLITE                                                                              | 16 |
| 2.1.2    | Origem e evolução dos DNAsat                                                                                           | 19 |
| 2.1.3    | DNAsat em Insetos                                                                                                      | 21 |
| 2.2      | O GÊNERO <i>Dichotomius</i> (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) COM ÊNFASE EM <i>Dichotomius schiffleri</i>                     | 23 |
| 2.2.1    | Características gerais de <i>Dichotomius schiffleri</i>                                                                | 24 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                              | 27 |
| 4.1      | MATERIAL BIOLÓGICO                                                                                                     | 27 |
| 4.2      | SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO DNAsat                                                                                     | 27 |
| 4.3      | IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNAsat                                                                                   | 28 |
| 4.4      | PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS, BANDEAMENTO C E HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i> FLUORESCENTE                                    | 29 |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                      | 30 |
| 5.1      | IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DNAsat EM <i>D. schiffleri</i>                                                      | 29 |
| 5.2      | MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE FAMÍLIAS DE DNAsat EM <i>D. schiffleri</i> E EM OUTRAS ESPÉCIES DO GRUPO <i>D. sericeus</i> | 32 |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>                                                                                                       | 36 |
| 6.1      | IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA DE <i>Dichotomius schiffleri</i>                                          | 36 |
| 6.2      | LOCALIZAÇÃO DE DIFERENTES DNAsat EM <i>D. schiffleri</i> E DOS MAIS ABUNDANTES EM ESPÉCIES DO GRUPO <i>D. sericeus</i> | 37 |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                                                                                      | 39 |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>              | <b>40</b> |
| <b>ANEXO A – <i>PRIMERS</i>.....</b> | <b>49</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O grupo *Dichotomius* (L.) *sericeus* pertence ao gênero *Dichotomius* Hope, 1838 (Coleoptera: Scarabaeidae) e possui espécies morfologicamente semelhantes endêmicas da Floresta Atlântica e Caatinga. Estas foram submetidas a revisão taxonômica recentemente, sendo descritas oito espécies incluindo *D. schiffleri*, que se destaca por sua importância ecológica e pelo seu *status* de ameaçada de extinção.

Além dos caracteres morfológicos, este grupo também tem sido alvo de estudos citogenéticos os quais revelaram conservação da macroestrutura cromossômica, com cariótipo de  $2n = 18$ , e cromossomos meta-submetacêntricos. Além disso, vários estudos foram direcionados a análise do DNA repetitivo (DNAsat) especialmente a heterocromatina constitutiva (HC) e a fração do DNA repetitivo (C0t-1), sendo observado que são predominantes nas regiões pericentroméricas dos cromossomos. Um dado interessante foi observado a partir do mapeamento heterólogo da fração do DNA repetitivo (C0t-1) isolado a partir de *D. geminatus* onde se constatou variação na composição e localização das sequências que compõem a HC do grupo *Dichotomius* (L.) *sericeus*.

Considerando que o DNAsat é o principal componente da HC e do seu envolvimento na manutenção e variabilidade desse tipo de cromatina, neste estudo analisamos e caracterizamos o satelitoma de *D. schiffleri*, com o intuito de investigar sua composição e distribuição no cariótipo da espécie. Além disso, verificamos se as famílias DNAsat abundantes são espécie-específicas em *D. schiffleri* ou se estão presentes e conservadas no cariótipo de espécies do grupo *D. sericeus*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar o satelitoma de *Dichotomius schiffleri* e mapear famílias de DNAsat, no intuito de investigar qual a distribuição dessas sequências no cariótipo da espécie. Além disso, verificar se os DNAsat mais representativos do satelitoma de *D. schiffleri* estão compartilhados em outras espécies do grupo *D. sericeus*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Identificar e caracterizar o satelitoma de *Dichotomius schiffleri* (Scarabaeidae: Coleoptera), com a finalidade de classificar as famílias de DNAsat que compõem o genoma dessa espécie.
2. Realizar o mapeamento cromossômico de famílias DNAsat, visando analisar a distribuição destas sequências no cariótipo de *D. schiffleri*.
3. Realizar o mapeamento cromossômico heterólogo das famílias DNAsat mais abundantes e isoladas em *D. schiffleri*, em quatro espécies do grupo *D. sericeus* (*D. guaribensis*; *D. gilletti* e *D. iannuzziae*), com a finalidade de investigar se esses DNAsat são espécie-específicos ou se são compartilhados com outros representantes do grupo.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

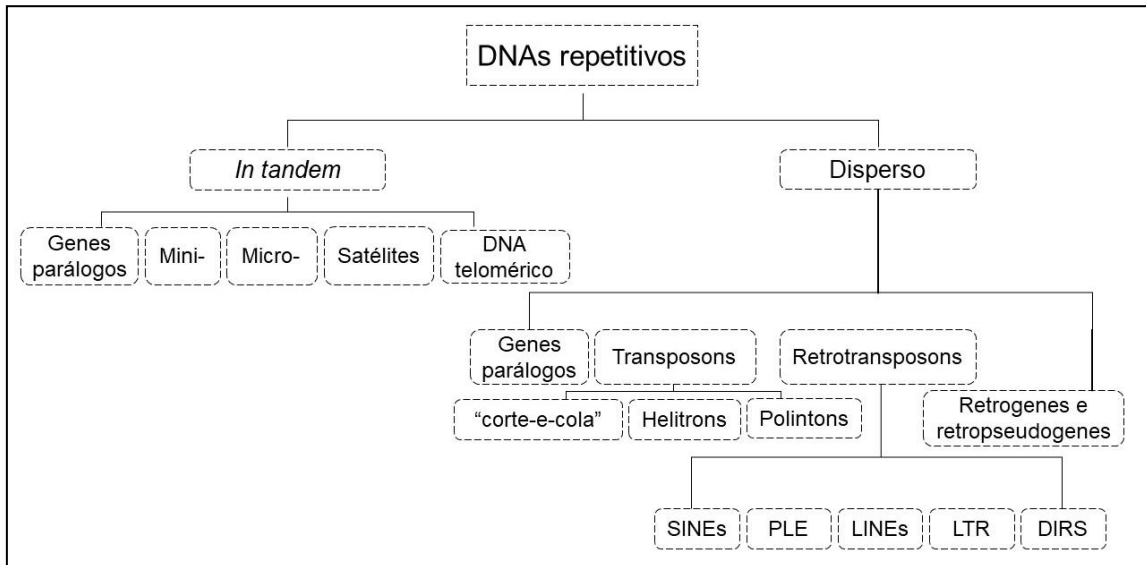
### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O DNA SATÉLITE

Os DNAs repetitivos ocorrem em todos os organismos vivos e, embora representem a maior fração do genoma eucarionte, foram inicialmente considerados sequências de DNA lixo (“*junk DNAs*”) devido ao desconhecimento de sua atividade funcional (Ohno, 1972; Long e Dawid, 1980). Contudo, com o advento de novas ferramentas de análise genômica – como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e análises *in silico*; o estudo do DNA repetitivo voltou a ser de grande interesse dadas as evidências de seu envolvimento em importantes processos celulares como na organização e manutenção do genoma (Saphiro e Sternberg, 2005; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012; Garrido-Ramos, 2017).

Os DNAs repetitivos podem estar arrançados de modo disperso no genoma, como por exemplo, os elementos transponíveis; ou *in tandem*, isto é, lado-a-lado, representado pelos genes de algumas famílias multigênicas, como os DNAs ribossomais (DNAr) e DNAs satélites (Figura 1) (Long e Dawid, 1980; Charlesworth *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 2008).

Os DNAs satélites correspondem a uma das classes de DNAs repetitivos mais abundantes em eucariontes (Garrido-Ramos, 2017). Historicamente, o termo “DNA satélite” foi proposto a partir de experimentos de centrifugação em gradiente de densidade onde, fragmentos compostos por frações satélites foram isolados da porção principal do DNA genômico mais densas devido a sua natureza flutuante (Walker, 1971; John e Miklos, 1979; Plohl *et al.*, 2012).

**Figura 1.** Classificação dos diferentes tipos de sequências de DNAs repetitivos encontrados nos genomas eucariontes.

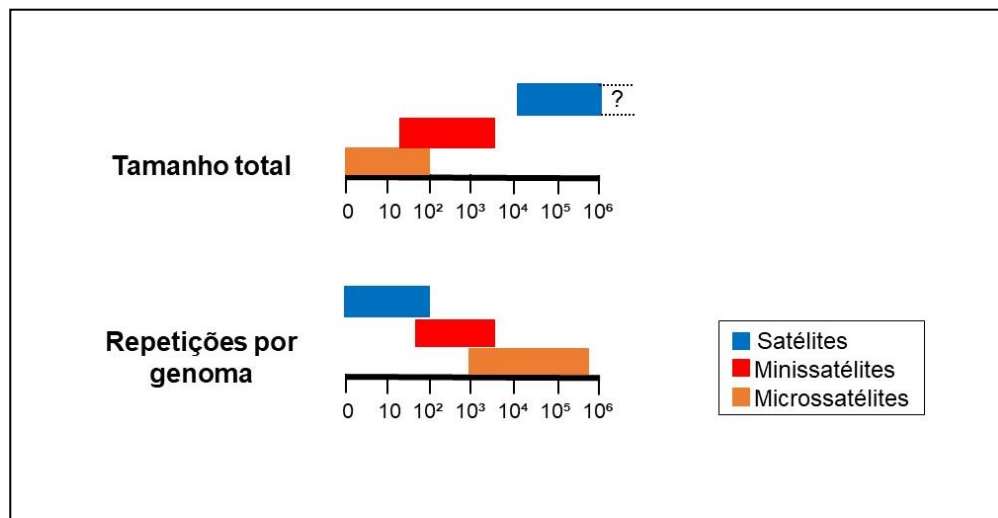


Fonte: Modificado de Garrido-Ramos (2017).

De modo geral, os DNAs satélites são classificados em função do número total de repetições e o tamanho de suas unidades repetitivas (Charlesworth *et al.*, 1994). Desta forma, três classes foram descritas, sendo elas: os microsatélites (1-10 pb) e minissatélites (>10 pb), ambas moderadamente repetitivas e, por último, os satélites ou DNAsat, com unidades de repetições que demonstram uma grande variação de tamanho e que são altamente repetitivas no genoma (Figura 2) (Charlesworth *et al.*, 1994; Plohl *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2016).

Apesar da referência de um número mínimo de repetições, não há um consenso em relação ao tamanho das unidades repetitivas definidas para cada classe. Desta forma, Ruiz-Ruano *et al.* (2016a) demonstraram que microsatélites, minissatélites e satélites são essencialmente semelhantes e propuseram o termo “satelitoma” para agrupar todos os tipos de DNAsat presentes em um genoma. Além disso, os DNAsat também podem ser classificados em superfamílias, famílias e variantes de acordo com o nível de identidade entre sequências, quando possuem uma identidade inferior a 50%, são considerados membros de superfamílias diferentes, entre 50 à 80% de identidade são considerados famílias DNAsat diferentes em uma mesma superfamília, acima de 80% considerados variante de uma mesma família e a mesma variante quando a identidade é superior a 95% (Ruiz-Ruano *et al.*, 2018a)

**Figura 2.** Tamanho total e abundância das sequências satélites em eucariontes. Em cada categoria (Microssatélites, Minissatélites e Satélites) o tamanho total e o número de ocorrência no genoma estão apresentados em escala logarítmica.



Fonte: Modificado de Richard *et al.* (2008).

Os DNAsat correspondem ao principal componente da heterocromatina constitutiva (HC) em eucariontes e são geralmente localizados formando grandes blocos em regiões centroméricas ou teloméricas dos cromossomos (Bostock, 1980; Singer, 1982; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Contudo, recentemente a presença destas sequências em regiões eucromáticas também foi descrita em alguns organismos, como em plantas (Sola-Campoy *et al.*, 2015) e insetos (Feliciello *et al.*, 2014; Larracuent, 2014).

Embora os DNAsat tenham sido por décadas considerados sequências sem utilidade para o genoma, atualmente, existem diversas evidências do papel funcional que estas sequências executam ao nível genômico e citológico (Garrido-Ramos, 2017). Em alguns estudos foi observado que existem DNAsat de diversos organismos, incluindo vertebrados, invertebrados e plantas, que possuem atividade transcricional onde os transcritos atuam em processos regulatórios que incluem desde a expressão gênica, bem como a resposta ao stress e modificações epigenéticas (Ugarkovic, 2005; Feliciello *et al.*, 2015; Ferree, 2017). Além disso, os DNAsat também podem atuar na organização cromossômica, emparelhamento e segregação meiótica (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016b; Samoluk *et al.*, 2016; Garrido-Ramos, 2017).

### 2.1.2 Origem e evolução dos DNAsat

A extrema diversidade de DNAsat no genoma e o ainda limitado conhecimento sobre a sua estrutura, organização e importância funcional, dificultaram a conclusão de estudos sobre a dinâmica evolutiva destas sequências (Plohl *et al.*, 2012). Contudo, esse panorama tem sido recentemente modificado a partir do advento de novos métodos de análise genômica – tais como ferramentas de análise *in silico* de *reads* NGS; os quais permitem, hoje, investigar aspectos como a origem e evolução dos satélites (Garrido-Ramos, 2017).

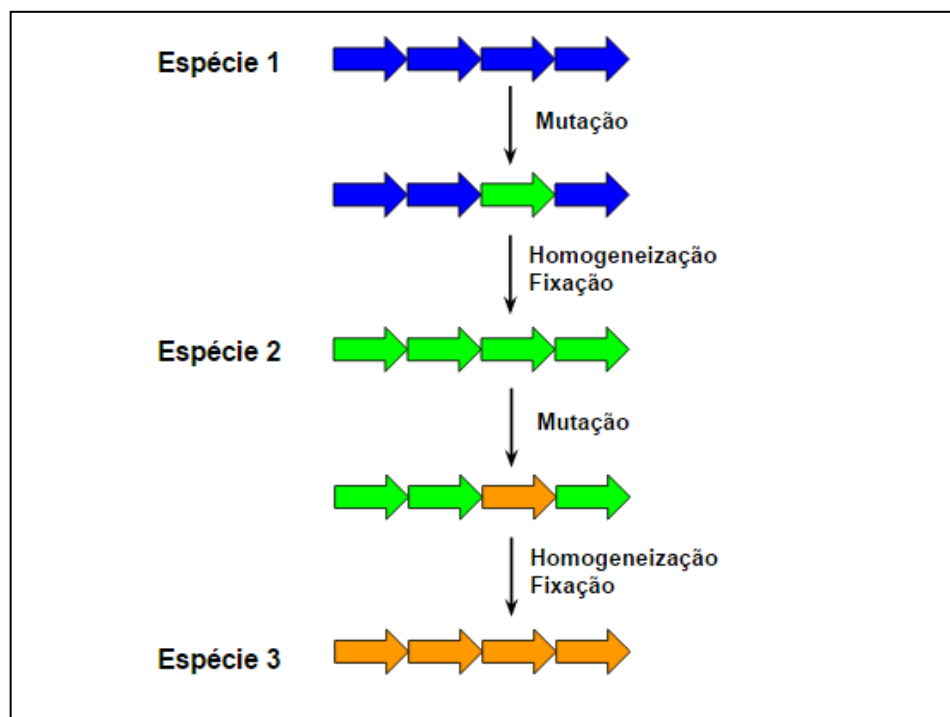
Os DNAsat apresentam grande complexidade evolutiva, com contínua origem e amplificação de suas famílias (Vittorazzi *et al.*, 2014). Segundo Ruiz-Ruano *et al.* (2016a), o nascimento de uma nova família DNAsat implica em uma duplicação *de novo* de uma sequência de dois ou mais pb que, por mecanismos moleculares como *slippage* do DNA, podem originar uma repetição *in tandem* localmente. Em um segundo momento, essa família de DNAsat pode ser disseminada para outras partes do genoma a partir de eventos moleculares como transposição via elementos de transposição (TEs). Essas unidades de repetições mais curtas podem, então, ser amplificadas e resultar em uma unidade maior e visível em técnicas cito-moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Garrido-Ramos, 2017).

Além de sua complexa dinâmica evolutiva, os DNAsat são também conhecidos por apresentarem grande diversidade de sequências, mesmo entre espécies filogeneticamente próximas (Liao, 1999; Plohl *et al.*, 2008, 2012). Contudo, ao contrário do que se espera na ausência de restrições seletivas, dentro de uma dada espécie a divergência entre monômeros de uma família DNAsat, é geralmente muito baixa, seguindo um padrão de evolução em concerto (Liao, 1999; Plohl *et al.*, 2008, 2012; Garrido-Ramos, 2017).

A evolução em concerto é um fenômeno biológico que pode explicar a evolução coesiva e gradual observada em DNAs satélites e que consiste em um processo evolutivo de dois níveis conhecido como *Molecular Driver* (Figura 3). No primeiro nível, as mutações ocorrentes em um único monômero são homogeneizadas para os monômeros adjacentes através de mecanismos de transferência não recíproca, tais como o *crossing-over* desigual, conversão gênica ou pela perda ou ganho de sequências mediadas por elementos transponíveis (Dover, 1982, 1986; Ugarkovic e

Plohl, 2002; Garrido-Ramos, 2017). Quanto ao segundo nível, monômeros variantes são fixados no genoma através de eventos meióticos e segregação cromossômica (Dover, 1986; Plohl *et al.*, 2010). Juntos, esses níveis podem contribuir para o isolamento e especiação de uma população em particular (Plohl *et al.*, 2012; Feliciello *et al.*, 2014).

**Figura 3.** Representação esquemática da evolução em concerto, onde uma mutação ocorrente na espécie ancestral 1 (setas azuis) sofre homogeneização e fixação, com posterior isolamento reprodutivo e especiação na espécie 2 (setas verdes) e 3 (setas laranjas).

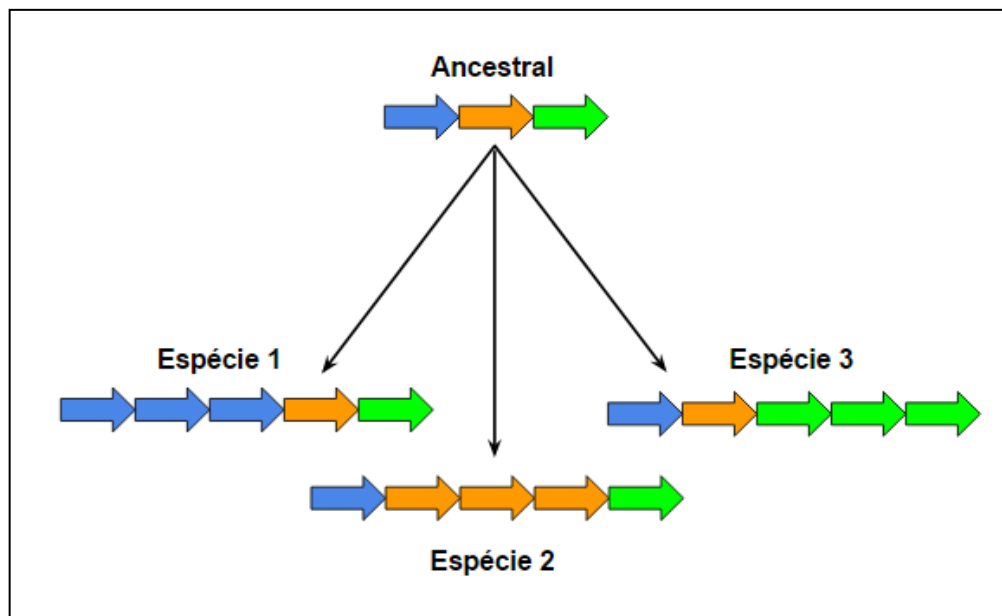


Fonte: Modificado de Plohl *et al.*(2012).

Além da evolução ao nível de sequências, os DNAsat também possuem a capacidade de evoluir em relação ao número de cópias, como resultado da expansão de suas unidades repetitivas (Ugarkovic e Plohl, 2002; Plohl *et al.*, 2012). Inicialmente postulado por Fry e Salser (1977) e demonstrado experimentalmente por Mestrovic *et al.* (1998), a hipótese de biblioteca ou *Library Concept* assume que mais de uma família DNAsat coexiste no genoma ancestral, constituindo uma espécie de “coleção” permanente de diferentes DNAsat, que podem ser diferencialmente amplificados em um grupo de espécies descendentes (Figura 4) (Plohl *et al.*, 2008, 2012, 2010; Garrido-Ramos, 2017). Como consequência, cada espécie pode apresentar uma

família DNAsat como “*major satellite*”, enquanto que as demais famílias permanecem em baixo número de cópias (Pezer *et al.*, 2011). Tais flutuações no número de cópias podem ser mediadas por mecanismos moleculares que envolvem transposição, replicação em círculo rolante ou *crossing-over* desigual, os quais são suficientes para criar perfis espécie-específicos em espécies próximas (Mestrovic *et al.*, 1998; Giovannotti *et al.*, 2014; Louzada *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016; Garrido-Ramos, 2017). Portanto, alguns DNAsat apresentam distribuição do tipo espécie-específica, demonstrando ausência de similaridade em suas sequências de nucleotídeos, mesmo entre espécies cogenéricas (Plohl *et al.*, 1998; Jagannathan *et al.*, 2017).

**Figura 4.** Representação esquemática da hipótese de biblioteca, na qual o genoma ancestral possui um pool de três diferentes famílias DNAsat (setas coloridas) que são diferencialmente amplificadas nas espécies descendentes.



Fonte: Modificado de Plohl *et al.*(2012).

### 2.1.3 DNAsat em Insetos

Na classe Insecta a caracterização do DNAsat foi realizada em apenas 25% das ordens descritas. A maioria dos organismos estudados pertencem às ordens Diptera, Hymenoptera, Orthoptera e em menor quantidade, Coleoptera (Lorite *et al.*, 2001, 2002; Cabrero *et al.*, 2003; Palomeque e Lorite, 2008; Pezer *et al.*, 2011). Em geral, estes estudos revelaram que o conteúdo de DNAsat pode representar quase

50% do genoma nuclear desses insetos, embora a real abundância destas sequências possa ser maior do que o estimado (Mestrovic *et al.*, 1998; Plohl *et al.*, 1998; López-Flores e Garrido-Ramos, 2012).

Os DNAsat em insetos apresentam grande variação no tamanho dos monômeros e foram historicamente classificados de acordo com o tamanho de suas unidades repetitivas em simples ou complexo, onde os DNAsat simples correspondem aos monômeros menores que 100 pb, enquanto que os complexos são maiores que 100 pb (King e Cummings, 1997; Palomeque e Lorite, 2008). Atualmente esses termos foram substituídos por DNAsat curto (<100 pb) ou longo (>100 pb) (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a).

Essa grande variação no tamanho dos DNAsat pode ser observada no satelitoma do grilo *Eneoptera surinamensis* (De Geer, 1773) que apresentou repetições curtas de quatro, oito e 10 pb e também DNAsat longo de até 517 pb de tamanho (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017). Embora essas classificações possam ser reconhecidas em insetos, algumas espécies demonstraram tamanhos excepcionais, como a formiga *Monomorium subopacum*, que possui monômeros satélites maiores que 2 kb de tamanho (Lorite *et al.*, 2004).

Os dados de mapeamentos cromossômicos do DNAsat de insetos demonstraram que estas sequências estão preferencialmente localizadas nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, ricas em heterocromatina, o que corresponde a um padrão comum em eucariontes (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a; Milani *et al.*, 2017). Contudo, a presença de famílias DNAsat em porções eucromáticas também foi descrita em alguns insetos, como na mosca *Drosophila melanogaster* (Larracuenta, 2014). Quanto a distribuição cromossômica do DNAsat, uma dada família pode estar presente apenas em um único par cromossômico, em todos os cromossomos ou irregularmente em cromossomos diferentes (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a). Além disso, um único par cromossômico pode acumular mais de uma família, como observado em cromossomos sexuais do grilo *E. surinamensis*, que apresentou 39 famílias DNAsat acumuladas no neo-Y (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017).

Em termos de diversidade de espécies, a ordem Coleoptera é a mais representativa da classe Insecta (Costa, 2000), no entanto, estudos com DNAsat foram realizados em apenas poucas espécies pertencentes às famílias Tenebrionidae e Chrysomelidae (Plohl *et al.*, 1993; Lorite, 2001; Mravinac e Plohl, 2010). Em geral,

estes estudos demonstraram que o DNAsat pode representar quase metade da porção do genoma nuclear dos coleópteros e apresentam riqueza de até 80% em pares de bases AT, podendo induzir a formação de curvaturas na própria molécula de DNA (Plohl *et al.*, 1998; Pons *et al.*, 2004; Lorite *et al.*, 2013).

Análises moleculares realizadas em besouros da família Tenebrionidae revelaram que a evolução dos DNAsat nessa família se deve, principalmente, à ocorrência de mutações de ponto, especialmente substituições de nucleotídeos (Juan *et al.*, 1993; Plohl *et al.*, 1993, 1994). Além disso, Feliciello *et al.* (2014) demonstraram pela primeira vez evidências de distintos perfis de DNAsat em nível populacional e reforçaram a hipótese de que o DNAsat pode atuar na divergência evolutiva de espécies próximas.

O mapeamento cromossômico de DNAsat em coleópteros, embora escasso, revelou que estas sequências estão preferencialmente distribuídas em regiões heterocromáticas de todos os cromossomos, como observado em espécies de alguns gêneros da família Tenebrionidae (Juan *et al.*, 1993; Mestrovic *et al.*, 1998; Mravinac *et al.*, 2005, 2010) e Chrysomelidae (Lorite *et al.*, 2001; Palomeque *et al.*, 2005). Contudo, mais recentemente, a presença de sequências satélites em porções eucromáticas também foi observada em Coleoptera, no besouro *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae), onde algumas famílias DNAsat estão preferencialmente dispersas na eucromatina (Feliciello *et al.*, 2014).

## 2.2 O GÊNERO *Dichotomius* (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) COM ÊNFASE EM *Dichotomius schiffleri*

Segundo Lawrence e Newton (1995), Coleoptera possui 127 famílias distribuídas na região neotropical, das quais, Scarabaeidae (Scarabaeoidea) se destaca por sua grande diversidade em espécies e por agrupar a subfamília Scarabaeinae, cujos besouros são popularmente conhecidos como “rola-bosta” e possuem grande importância ecológica (Halffter e Mathews, 1966). Por sua vez, a subfamília Scarabaeinae está distribuída em 11 tribos (Vaz-de-Mello, 2007; Génier, 2009) e possui aproximadamente 2000 gêneros, dos quais 49, incluindo o gênero *Dichotomius*, foram registrados no Brasil (Halffter, 1991; Browne e Scholtz, 1999; Valois *et al.*, 2017; Vaz-de-Mello, 2017).



O gênero *Dichotomius* foi descrito por Hope em 1838 e pertence a tribo Coprini (Montreuil, 1998). Com distribuição endêmica no continente americano, os representantes desse gênero são geralmente encontrados em áreas florestais ou em savanas neotropicais e tipicamente apresentam hábito alimentar coprófago, ou seja, se alimentam de fezes de mamíferos (Vaz-de-Mello, 1999; Aidar *et al.*, 2000). Contudo, algumas espécies do gênero apresentam hábitos alimentares alternativos, podendo utilizar como recurso alimentar ovos de aves ou répteis e carne em putrefação (Louzada e Vaz-de-Mello, 1997).

Além disso, a maioria dos representantes de *Dichotomius* apresentam a estratégia de alocação de recurso do tipo paracoprídea, ou seja, escavam tuneis abaixo ou ao lado da fonte de alimento e enterram porções deste para a manutenção do ninho (Hanski e Cambefort, 1991; Koller *et al.*, 1999). Desta forma, devido ao hábito coprófago e paracoprídeo, *Dichotomius* desempenha um importante papel ecológico, contribuindo para a decomposição da matéria orgânica e reciclagem dos nutrientes (Halffter e Mathews, 1966; Bang *et al.*, 2005).

Dentre os quatro subgêneros inclusos em *Dichotomius*, *Luederwaldtinia* se destaca pela diversidade de espécies no Brasil e por incluir vários grupos ou complexos de espécies morfologicamente semelhantes, como o grupo *Dichotomius* (L.) *sericeus* (Harold, 1867) (Vaz-de-Mello *et al.*, 2000, 2001). Este grupo foi recentemente alvo de revisão taxonômica por Valois *et al.* (2017) onde oito espécies endêmicas de Floresta Atlântica e Caatinga foram reconhecidas, são elas: *D. sericeus*, *D. irinus*, *D. laevicollis*, *D. schiffleri*, *D. guaribensis*, *D. giletti*, *D. iannuzziae* e *D. catimbaus*, sendo as cinco últimas ocorrentes em Pernambuco.

### **2.2.1 Características gerais de *Dichotomius schiffleri***

A espécie *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino (2001) é morfologicamente distinguida das demais espécies do grupo *D. sericeus* por não apresentar armadura cefálica e por ser mais alongada e achatada dorso-ventralmente (Figura 5) (Vaz-de-Mello *et al.*, 2001; Valois *et al.*, 2017). Representantes de *D. schiffleri* estão predominantemente distribuídos em áreas de restinga no Brasil e, até o momento, foram registrados apenas em regiões de ecossistema costeiro dos

estados da Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Pernambuco (PE) e Sergipe (SE) (Vieira *et al.*, 2011).

**Figura 5.** Exemplar da espécie *Dichotomius schiffleri*.



Fonte: Valois *et al.*, 2017

Assim como a maioria das espécies do gênero, *D. schiffleri* apresenta hábito alimentar preferencialmente coprófago e estratégia paracoprídea. Além disso, é considerada uma espécie bioindicadora ambiental, uma vez que só ocorre em abundância em áreas de ecossistemas preservados (Vieira, 2008). Desta forma, as modificações e fragmentação das florestas tropicais reduziram as populações de *D. schiffleri* e contribuíram para inclusão de *D. schiffleri* na Lista Vermelha da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do IUCN e IBAMA (Vaz-de-Mello e Louzada, 2008; Vieira *et al.*, 2011; IUCN, 2013; Costa *et al.*, 2014).

Estudos citogenéticos realizados em *D. schiffleri* revelaram número diploide  $2n = 18$  e morfologia cromossômica meta-submetacêntrica, cariótipo frequentemente observado nas espécies do gênero *Dichotomius* (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a, b; Xavier *et al.*, 2014). Em relação aos cromossomos sexuais, *D. schiffleri* apresenta mecanismo sexual Xy na configuração em bastão ( $Xy_r$ ), semelhante ao que foi observado em indivíduos de *D. sericeus* (Silva *et al.*, 2009). O bandeamento C e o mapeamento da fração de DNA *Cot-1* revelaram dados semelhantes às demais espécies do gênero analisadas, com predominância da HC nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, exceto no cromossomo y diminuto (Xavier *et al.*, 2014). Além disso, através da tríplice coloração (CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI) foi observado que a HC é predominante neutra, sendo rica em GC no terceiro par

autossômico. A impregnação com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) mostrou blocos terminais no terceiro par autossômico, que corresponde a região rica em GC (Xavier, 2013).

O mapeamento cromossômico com os genes de famílias multigênicas DNA ribossomal (DNAr) 18S, 5S e histonas H3 foi realizado, sendo observado que os sítios de DNAr 18S estão localizados no terceiro par autossômico, enquanto que os genes de DNAr 5S e histonas H3 foram co-localizados na região proximal do segundo par autossômico (Xavier, 2013). Além disso, o mapeamento cromossômico com elementos de transposição demonstrou que o elemento *DsmarMITE* está localizado em regiões eucromáticas dos cromossomos, sugerindo que este elemento não está envolvido na variação de composição e localização da HC em *Dichotomius* (Xavier et al., 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os Indivíduos de *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada & Gavino 2001 foram coletados na Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN) Nossa Senhora do Outeiro (08°31'48"S e 35°01'05"O) em Ipojuca, Pernambuco, Brasil, onde também foram coletados espécimes de *D. guaribensis* Valois, Vaz-de-Mello & Silva 2017. Além disso, as espécies *D. gilletti* e *D. iannuzziae* Valois, Vaz-de-Mello & Silva 2017 foram coletadas em Mata de Jangadinha, no município de Jaboatão dos Guararapes – PE (08°05'34"S e 34°58'48"O) e no município de Jurema – PE (8°47'76"S e 36°08'00"O), respectivamente (Figura 6). As coletas foram realizadas com autorização do IBAMA, licença 50438-2 (SISBIO) específica para *D. schiffleri*, e licença 16278-1 (SISBIO) para as outras espécies.

**Figura 6.** Mapa de Pernambuco. Município de Ipojuca em azul, Jaboatão dos Guararapes em verde e Jurema em vermelho.



Fonte: Google Maps.

As gônadas dos machos foram fixadas em Carnoy (3:1 etanol: ácido acético) e acondicionadas em -20 °C para as análises citológicas. Os indivíduos foram preservados em álcool absoluto, acondicionados a -20 °C para extração do DNA genômico e incluídos no banco de germoplasma do Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos (LBGI), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Pernambuco (UPE).

### 4.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO DNAsat

O sequenciamento do genoma de um indivíduo de *D. schiffleri* foi realizado na plataforma Solexa-Illumina HiSeq 2000, com abordagem *paired end*, leitura média de 100 pb e cobertura de 0.8x. As sequências obtidas foram submetidas no *Trimmomatic* 0.36 (Bolger *et al.*, 2014) para remover os *reads* com baixa qualidade de sequenciamento, e clusterizadas no web servidor Repeat Explorer (Novák *et al.*, 2010; 2013). Os DNAsat foram identificados inicialmente a partir de *clusters* que apresentaram gráficos em formato esférico ou em anel, e com densidade superior a 0.1 (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a). Além disso, nesses *clusters* foi verificado o resultado do *Domain hits* e do *Repeat Masker*. Os *clusters* selecionados foram carregados no servidor *Tandem Repeat Finder* 0.49 com parâmetros 2, 3, 5 para *match*, *mismatch* e *indels*, respectivamente, e a organização *in tandem* foi confirmada com o *Dotlet* (Junier e Pagni, 2000).

Para a caracterização do DNAsat foram utilizados, em *default settings*, os softwares Geneious 4.5.8 para o alinhamento dos monômeros e obtenção da sequência consenso, MEGA7 para calcular o conteúdo em pares de bases A+T (%) e MUSCLE para analisar a homologia entre os DNAsat identificados. Aqueles que demonstraram identidade inferior a 50% foram considerados membros de diferentes superfamílias, enquanto que uma identidade entre 50 a 80% indicava diferentes famílias DNAsat de uma mesma superfamília. Quando a identidade era superior a 80%, foram considerados variantes de uma mesma família e uma mesma variante quando superior a 95% de identidade (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a, b). A nomenclatura de cada família DNAsat foi atribuída segundo Ruiz-Ruano *et al.* (2016a).

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNAsat

Para isolar os DNAsat identificados no genoma de *D. schiffleri*, foram desenhados 24 pares de *primers*. Os quais foram desenhados no *Primer3Plus* (bioinformatics.nl/primer3plus) para famílias DNAsat com monômero superiores a 50 pb, enquanto que os *primers* para DNAsat de tamanho inferior a 50 pb foram desenhados manualmente e analisados quanto a viabilidade no servidor OligoAnalyzer 3.1 (IDT) (idtdna.com/calc/analyzer) (Anexo 1). A amplificação do DNAsat foi realizada por PCR (*Polymerase chain reaction*) em termociclador Biocycler (MG96G) com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 98 °C

durante 30 s, com temperatura de anelamento entre 45 – 59 °C por 30 s e 72 °C durante 1 min e 20 s, e com extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.4 PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS, BANDEAMENTO C E HIBRIDIZAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE

As células meióticas foram obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares em ácido acético 65%, com auxílio de um Estereomicroscópio (Tecnival), fixadas nas lâminas a 45 °C durante 2 min e posteriormente coradas com Giemsa 5 %. O bandejamento C seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972).

A Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada de 24 famílias DNAsat nos cariótipos de 15 indivíduos machos de *D. schiffleri*, de acordo com o protocolo descrito em Cabral-de-Mello (2013). Os dois DNAsat mais abundantes foram mapeados também nas espécies *D. gilletti*, *D. guaribensis* e *D. iannuzziae*. As sondas foram obtidas por PCR e marcadas por *nick translation* com biotina-14-dATP (Invitrogen) ou através da PCR com digoxigenina-11-dUTP (Roche). Estas sondas foram detectadas por avidina FITC (Invitrogen) e anti-digoxigenina-rodamina (Roche), respectivamente. As imagens das células analisadas foram capturadas através do microscópio de epifluorescência Leica DM 2500, com câmera digital acoplada. O brilho e o contraste das fotos foram otimizados com Photoshop CS6.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DNAsat EM *D. schiffleri*

As sequências repetitivas de *D. schiffleri* foram agrupadas em 228 diferentes *clusters*, dos quais 26 apresentaram densidade e gráficos típicos para DNAsat. A caracterização desses *clusters* revelou a ocorrência de 26 diferentes famílias DNAsat, dentre as quais DscSat01-224, DscSat02-170 e Dscsat03-30 são as mais abundantes e juntas representam 25% das sequências obtidas nessa espécie. Esses DNAsat demonstraram ainda uma grande variação no tamanho dos monômeros (12 à 224 pb) e uma notável riqueza no conteúdo de AT (de 44,4 até 95,2%) (Tabela 1).

A análise do *Repeat Masker* no *RepeatExplorer* revelou que os 26 *clusters* identificados não apresentaram domínios ou altos *hits* com elementos de transposição (TEs). Adicionalmente, nesses *clusters* não foram observadas regiões terminais invertidas, características comuns para elementos degenerados do tipo *MITE*.

Baseado na análise de homologias foram caracterizadas 54 sequências variantes, em uma proporção de uma a 10 variantes por família DNAsat. A análise de similaridade entre as sequências consenso das 26 famílias DNAsat permitiu ainda organizá-las em quatro diferentes superfamílias (SFs) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização do satelitoma de *Dichotomius schiffleri*.

| CL  | SF | Família DNAsat | TM  | AT%  | V  | Densidade | Abundância relativa (%) |
|-----|----|----------------|-----|------|----|-----------|-------------------------|
| 1   | 1  | DscSat01-224   | 224 | 76,4 | 6  | 0.5388    | 16.400                  |
| 2   | 1  | DscSat02-170   | 170 | 77,8 | 7  | 0.7739    | 8.560                   |
| 2   | 1  | DscSat03-30    | 30  | 73,3 | 1  | 0.7739    | 8.560                   |
| 17  | 1  | DscSat04-148   | 148 | 61,9 | 3  | 0.1215    | 0.274                   |
| 36  | 1  | DscSat05-38    | 38  | 92,1 | 2  | 0.3571    | 0.110                   |
| 36  | 1  | DscSat06-110*  | 110 | 87,2 | 4  | 0.3571    | 0.110                   |
| 74  | 1  | DscSat07-76    | 76  | 80,5 | 10 | 0.1486    | 0.039                   |
| 81  | 2  | DscSat08-151*  | 151 | 70,9 | 1  | 0.2892    | 0.038                   |
| 106 | 3  | DscSat09-28    | 28  | 71,4 | 1  | 0.1485    | 0.029                   |
| 116 | 1  | DscSat10-22    | 22  | 68,2 | 1  | 0.1598    | 0.027                   |
| 121 | 4  | DscSat11-27    | 27  | 44,4 | 1  | 0.1181    | 0.025                   |
| 121 | 1  | DscSat12-24    | 24  | 54,2 | 1  | 0.1181    | 0.025                   |
| 129 | 1  | DscSat13-21    | 21  | 95,2 | 1  | 0.2202    | 0.023                   |
| 132 | 1  | DscSat14-19    | 19  | 57,9 | 1  | 0.2504    | 0.024                   |
| 136 | 1  | DscSat15-22    | 22  | 81,8 | 2  | 0.129     | 0.021                   |
| 144 | 1  | DscSat16-57    | 57  | 61,4 | 1  | 0.2258    | 0.020                   |
| 144 | 1  | DscSat17-41    | 41  | 58,5 | 1  | 0.2258    | 0.020                   |
| 144 | 1  | DscSat18-22    | 22  | 54,5 | 1  | 0.2258    | 0.020                   |
| 144 | 1  | DscSat19-20    | 20  | 65   | 1  | 0.2258    | 0.020                   |
| 145 | 1  | DscSat20-21    | 21  | 85,7 | 1  | 0.1828    | 0.020                   |
| 146 | 1  | DscSat21-33    | 33  | 69,7 | 1  | 0.1505    | 0.020                   |
| 161 | 1  | DscSat22-13    | 13  | 76,9 | 1  | 0.1311    | 0.020                   |
| 182 | 1  | DscSat23-15    | 15  | 93,3 | 1  | 0.1594    | 0.016                   |
| 184 | 1  | DscSat24-18    | 18  | 61,1 | 2  | 0.1558    | 0.016                   |
| 184 | 1  | DsSat25-12     | 12  | 58,3 | 1  | 0.1558    | 0.016                   |
| 207 | 1  | DsSat26-20     | 20  | 70   | 1  | 0.2381    | 0.014                   |

Cluster (CL), superfamília (SF), família DNAsat, tamanho do monômero (TM), conteúdo em AT (%), número de variantes (V), densidade e abundância relativa de todos os DNAsat identificados no genoma de *D. schiffleri*. Em cada família, o tamanho dos monômeros e o conteúdo em AT é indicado para a variante mais abundante. \*Famílias DNAsat para as quais não foi possível desenhar primers viáveis.



## 5.2 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE FAMÍLIAS DE DNAsat EM *D. schiffleri* E EM OUTRAS ESPÉCIES DO GRUPO *D. sericeus*

O cariótipo  $2n = 18$ ,  $Xy_p$  com cromossomos meta-submetacêntricos foi observado em *D. schiffleri*, bem como nas outras três espécies próximas analisadas. Em *D. schiffleri*, o bandejamento C revelou a presença de blocos grandes de HC nas regiões pericentroméricas de todos os bivalentes e também nos cromossomos sexuais (Figura 7a).

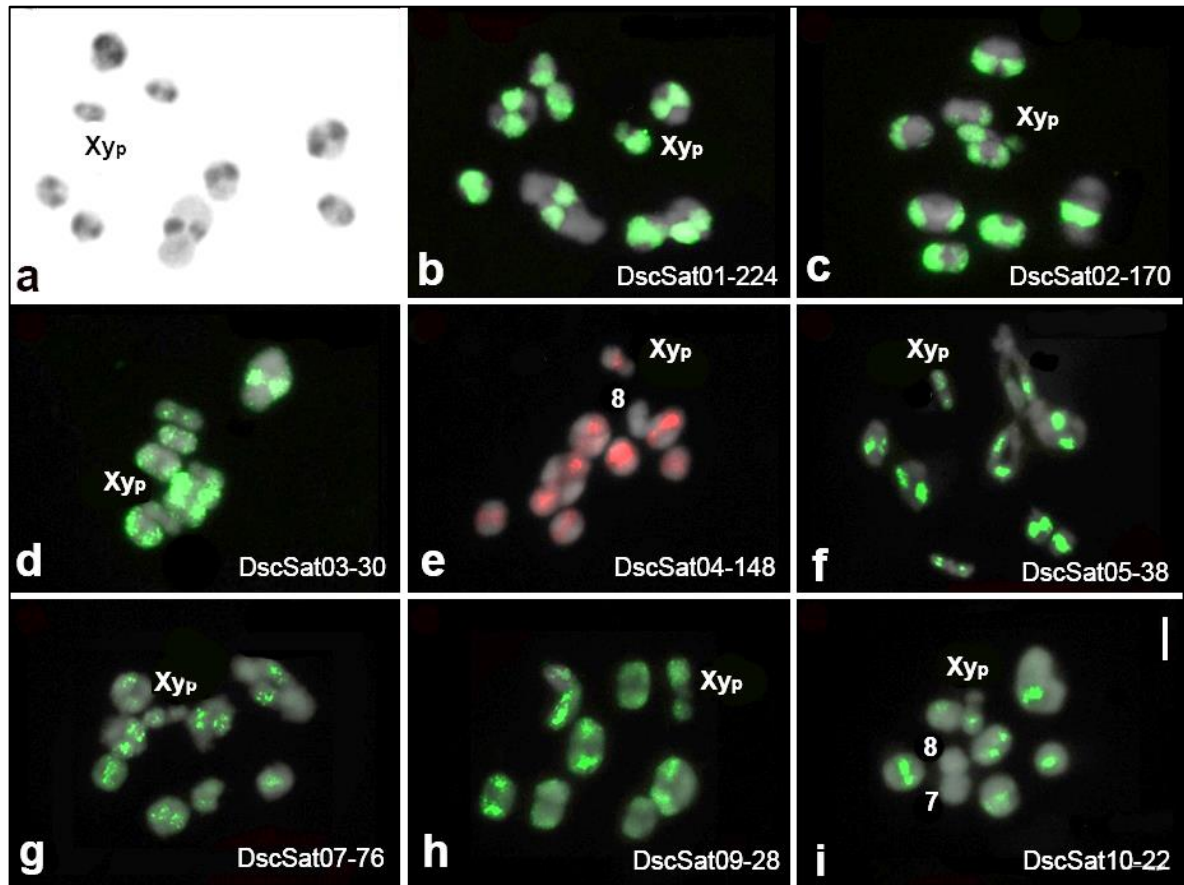
Das 26 famílias DNAsat caracterizadas, não foi possível desenhar *primers* viáveis para o isolamento das sondas de duas delas. Das 24 sondas hibridizadas, foi obtido resultado de mapeamento cromossômico para 15 delas. A localização desses DNAsat foi predominante nas regiões pericentroméricas, corresponde a região rica em heterocromatina constitutiva revelada pelo bandejamento C. Essas sequências foram observadas em todos os autossomos, exceto o DscSat10-22 no par sete e DscSat10-22, DscSat15-22, DscSat17-41, DscSat18-22 e DscSat20-21 no par oito (Tabela 2, Figura 7i, Figura 8b, d, e, f). Nos cromossomos sexuais foram observados todos os DNAsat mapeados, exceto os satélites DscSat18-22 e DscSat20-21 no cromossomo X e dos DscSat03-30, DscSat07-76, DscSat10-22, DscSat17-41, DscSat18-22 e DscSat20-21 no y diminuto (Figura 7d, g, i, Figura 8d, e, f). Dentre os satélites mapeados, a família DscSat04-148 foi a única que apresentou sinais intersticiais, sendo localizada em todos os cromossomos, exceto no par 8 (Tabela 2, Figura 7e).

Em *D. gilletti*, *D. guaribensis* e *D. iannuzziae*, o mapeamento das famílias DscSat01-224 e DscSat02-170 revelou a dispersão dessas sequências ao longo dos cromossomos. Apesar disso, foi possível observar grandes blocos dessas sequências nas regiões pericentroméricas de todos os autossomos (Figura 9).

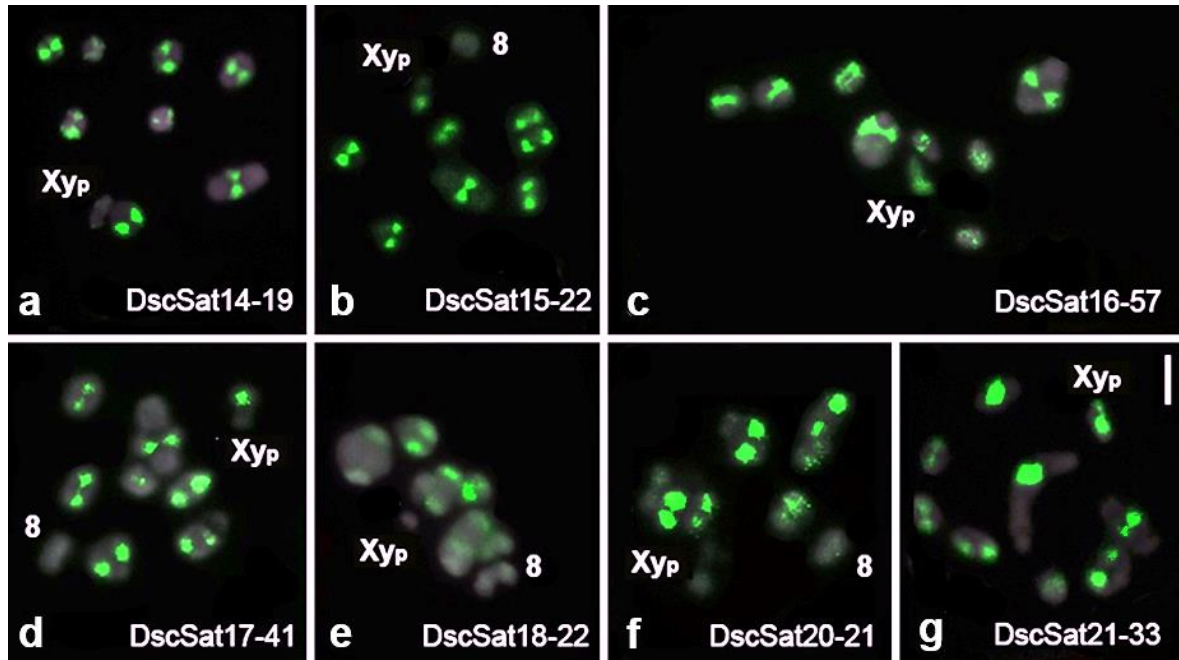
**Tabela 2.** Mapeamento cromossômico de DNAsat em *Dichotomius schiffleri*. Família DNAsat, tamanho do monômero (TM) e localização cromossômica de famílias DNAsat (p = pericentromérica; i = intersticial; + = presente; - = ausente)

[illegible]

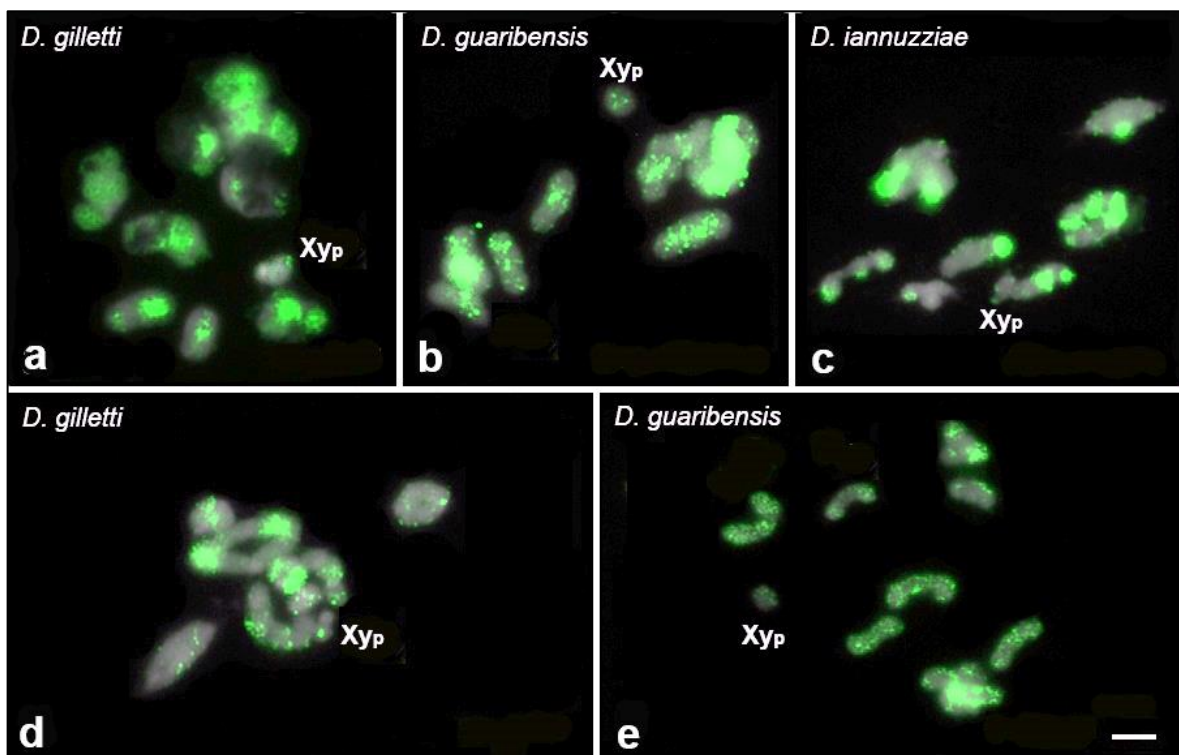
**Figura 7.** Bandeamento C e mapeamento cromossômico de diferentes famílias DNAsat em *Dichotomius schiffleri*. (a) Bandeamento C, (b-i) DscSat01-224 (b), DscSat02-170 (c), DscSat03-30 (d), DscSat04-148 (e), DscSat05-38 (f), DscSat07-76 (g), DscSat09-28 (h) e DscSat10-22 (i). Os números indicam os bivalentes autossômicos sem marcação. Bar = 5µm.



**Figura 8.** Mapeamento cromossômico de diferentes famílias DNAsat em *Dichotomius schiffleri*. DscSat14-19 (a), DscSat15-22 em (b), DscSat16-57 (c), DscSat17-41 (d), DscSat18-22 (e), DscSat20-21 (f) e DscSat21-33 (g). Os números indicam os bivalentes autossômicos sem marcação. Bar = 5µm.



**Figura 9.** Mapeamento heterólogo das duas famílias mais abundantes de *Dichotomius schiffleri* em espécies do grupo *D. sericeus*. DscSat01-224 em *D. gilletti* (a), *D. guaribensis* (b), *D. iannuzziae* (c) e DscSat02-170 em *D. gilletti* (d) e *D. guaribensis* (e). Bar = 5µm.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA DE *Dichotomius schiffleri*

No presente estudo, o conjunto de DNAsat (satelitoma) foi descrito pela primeira vez em uma espécie da ordem Coleoptera. A ocorrência de diferentes famílias DNAsat em *Dichotomius schiffleri* demonstrou a diversidade dessas sequências no seu genoma, embora seja menor do que observado em outros insetos, como nos gafanhotos *Locusta migratoria* e *Pyrgomorpha conica*, os quais apresentaram 62 e 76 famílias DNAsat, respectivamente (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a, 2018). Isto se deve, provavelmente, as distintas histórias evolutivas dessas espécies, que podem ter sofrido diferentes processos de diversificação do DNAsat.

As diversas variantes que ocorrem dentro de uma família DNAsat em *D. schiffleri* indicam um eficaz processo de evolução em concerto do DNAsat onde, membros de uma mesma família geralmente apresentam um alto grau de similaridade devido a homogeneização das mutações ocorrentes (Plohl *et al.*, 2012; Garrido-Ramos, 2015). Além disso, a riqueza de DNAsat da superfamília SF01 de *D. schiffleri* está relacionada à existência de uma região conservada em comum, semelhante ao que foi descrito para as famílias DNAsat da superfamília mais abundante do gafanhoto *P. conica* (Ruiz-Ruano *et al.*, 2018).

Variações no tamanho dos monômeros, como observadas em *D. schiffleri*, foram descritas anteriormente em outras espécies, incluindo no besouro *Tribolium madens*, no gafanhoto *L. migratoria* e no grilo *Eneoptera surinamensis* (Palomeque e Lorite, 2008; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a; Palacios-Gimenez *et al.*, 2017). O satelitoma de *D. schiffleri* revelou ainda que os monômeros longos (maiores que 100 pb) são mais abundantes, o que pode estar relacionado com a teoria de que monômeros com esses tamanhos são favorecidos pela evolução, uma vez que facilitam o empacotamento dos nucleossomos presentes na HC (Schmidt e Helslop-Harrison, 1998; Henikoff *et al.*, 2001; Palomeque e Lorite, 2008; Pavlek *et al.*, 2015).

A riqueza em bases AT (%) dos DNAsat de *D. schiffleri* é uma característica comum e frequentemente descrita na literatura (Ugarkovic *et al.*, 1996; Mestrovic *et al.*, 1998; Scali e Tinti, 1999). No presente estudo, a riqueza de 95% de AT da família DscSat13-21 corresponde ao maior valor observado em Coleoptera, que até o

momento era de 79,3% no DNAsat TDEST de *Tribolium destructor* (Palomeque e Lorite, 2008) e o segundo maior em insetos, menor apenas que o DNAsat AATAT descrito em *D. melanogaster*, que possui 100% de riqueza em AT (Lohe e Brutlag, 1986). Essa riqueza de AT está relacionada possivelmente a atividade funcional desse DNAsat, incluindo a organização da estrutura terciária do DNA que facilita a correta interação entre o DNA e proteínas envolvidas na heterocromatinização (Palomeque e Lorite, 2008; Plohl *et al.*, 2008; Pezer *et al.*, 2011).

A ausência de domínios e regiões terminais invertidas, características para elementos de transposição, sugere que os DNAsat identificados em *D. schiffleri* não apresentam relação direta com TEs. Esse resultado contradiz trabalhos recentes, os quais demonstram relação entre essas sequências repetitivas, em especial *MITEs*, e a origem e propagação de famílias DNAsat (Satovic *et al.*, 2013, 2016; Mestrovic *et al.*, 2015). Isto sugere que, provavelmente, o satelitoma de *D. schiffleri* pode ter se originado a partir da duplicação *de novo* – a partir de mecanismos como replicação *slippage* e em círculo rolante – de um segmento curto, resultando em uma sequência de repetição *in tandem*, como descrito para diferentes DNAsat (Smith *et al.*, 1976; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a).

## 6.2 LOCALIZAÇÃO DE DIFERENTES DNAsat EM *D. schiffleri* E DOS MAIS ABUNDANTES EM ESPÉCIES DO GRUPO *D. sericeus*

O cariótipo de *D. schiffleri*, bem como de mais três espécies do grupo *D. sericeus* analisadas neste estudo, foi similar à de outros representantes do gênero *Dichotomius* (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a, b; Xavier *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2018). Além disso, a presença da HC nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de *D. schiffleri* foi coincidente com a descrição feita por Xavier *et al.*, (2014). Esse padrão é conservado no grupo *D. sericeus* e em outras espécies do gênero *Dichotomius* (Silva *et al.*, 2009; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a; Amorim *et al.*, 2018).

A distribuição das famílias de DNAsat nas regiões pericentroméricas dos cromossomos, como observado em *D. schiffleri*, foi descrita em espécies das famílias Tenebrionidae e Chrysomelidae (Coleoptera) (Plohl *et al.*, 1993, Ugarkovic *et al.*, 1996; Lorite *et al.*, 2001). Essa distribuição pode ser explicada pelo princípio da equilocidade da heterocromatina, isto é, a tendência da heterocromatina – e do

DNAsat – de ocupar as mesmas posições cromossômicas no cariótipo (John *et al.*, 1985; Garrido-Ramos, 2017). A predominância dos DNAsat nas regiões pericentroméricas indica que essas sequências podem exercer papéis genômico e/ou citológico essenciais, como na facilitação do acesso de proteínas responsáveis pela metilação do DNA na HC, bem como na organização e manutenção dos cromossomos (Feliciello *et al.*, 2013; Jagannathan *et al.*, 2018a, b).

Apesar de menos comum, a distribuição de DNAsat nas regiões intersticiais eucromáticas, como observado no presente estudo para o DscSat04-148 em *D. schiffleri*, foi também descrita em outros insetos, como em *Drosophila melanogaster*, no besouro *Tribolium castaneum* e no gafanhoto *L. migratoria* (Larracunte *et al.*, 2014; Feliciello *et al.*, 2015; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016a). Esta distribuição intersticial pode ser explicada pelo princípio de equilocidade da heterocromatina, onde a HC amplificada pode sofrer a transferência – a partir de rearranjos cromossômicos como inversão e/ou transposição – para outras regiões cromossômicas (Schweizer e Loidl, 1987).

Apesar dos DNAsat mapeados não apresentarem relação com elementos de transposição no *RepeatExplorer*, a localização de diferentes TEs na HC de *D. schiffleri*, principalmente do *DsGypsy8* e *DsPoltron2* (Costa, 2018), pode ter facilitado o processo de intersticialização do satélite DscSat04-148. Nas regiões eucromáticas os DNAsat, como o DscSat04-148, podem ainda estar envolvidos na regulação da expressão gênica e/ou manutenção da cromatina local, como descrito em espécies do gênero *Drosophila* (Kuhn *et al.*, 2012, 2015; Larracunte *et al.*, 2014) e no besouro *T. castaneum* (Feliciello *et al.*, 2014, 2015).

A presença das famílias de DNAsat mais abundantes de *D. schiffleri* (DscSat01-224 e DscSat02-170) nas espécies *D. gilletti*, *D. guaribensis* e *D. iannuzziae*, sugere uma herança ancestral dessas sequências e que estas não são espécie-específico. Embora, a variação interespecífica na localização dessas sequências revelou que os DNAsat mapeados são sequências evolutivamente dinâmicas. Esses dados sugerem que durante a diversificação evolutiva do grupo *D. sericeus*, os DNAsat DscSat01-224 e DscSat02-170, bem como descrito anteriormente para o DscSat04-148 em *D. schiffleri*, foram amplificados e sofreram processo de intersticialização a partir de rearranjos cromossômicos e/ou transposição (Cuadrado e Joune, 2002; Navajas-Pérez *et al.*, 2009).

## 7 CONCLUSÕES

1. O satelitoma da espécie *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae) é abundante em DNAsat longos que, provavelmente, facilitam o maior empacotamento dos nucleossomos presentes na HC dessa espécie.
2. A predominância da localização do DNAsat de *D. schiffleri* nas regiões pericentroméricas deve, provavelmente, ser resultado de um eficaz processo de equilocidade da heterocromatina.
3. A presença da família DNAsat DscSat04-148 em regiões eucromáticas no cariótipo de *D. schiffleri*, pode ser resultado da amplificação e rearranjo dessa sequência durante o processo de equilocidade, fazendo com que a mesma sofresse intersticialização.
4. Apesar das duas famílias DNAsat mais abundantes (DscSat01-224 e DscSat02-170) de *D. schiffleri* estarem presentes em outras três espécies do grupo *D. sericeus*, a variação interespecífica na localização dessas sequências sugere que o DNAsat em *Dichotomius* é dinâmico e deve estar envolvido no processo de diversificação do grupo *D. sericeus*, embora não seja espécie-específico.



## REFERÊNCIAS

- AIDAR, T et al. **Besouros coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) Coletados em Aquidauana, MS, Brasil.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29(4):817-820. 2000.
- AMORIM, I. C. et al. **Characterization and chromosomal mapping of the DgmarMITE transposon in populations of *Dichotomius (Luederwaldtinia) sericeus* species complex (Coleoptera: Scarabaeidae).** Genetics and Molecular Biology 4:12:419-425. 2018.
- BANG, H. S. et al. **Effects of paracoprid dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) on the growth of pasture herbage and on the underlying soil.** Applied Soil Ecology 29(2):165-171. 2005.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. **Repetitive DNA in eukaryotic genomes.** Chromosome Research 23(3):415-420. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30(15):2114-20. 2015.
- BOSTOCK, C. **A function for satellite DNA?** Trends in Biochemical Sciences 5(5):117-119. 1980.
- BROWNE, J e SCHOLTZ, C. H. **A phylogeny of the families of Scarabaeoidea (Coleoptera).** Systematic Entomology, 24:51-84. 1999.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. **Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis.** Genetica 139:315-325. 2011a.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. **Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin.** BMC Genetics 12:88. 2011b.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. **Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles.** Cytogenetic and Genome Research 134:127-135. 2011c.
- CABRERO, J. et al. **Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Euprepocnemis plorans*.** Chromosome Research 11:375-381. 2003.
- CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSK, P.; STEPHAN, W. **The evolution dynamics of Nucleosome structural features and intrinsic properties of the TATAACGCC repeats sequence.** Journal of Biological Chemistry 274:31847–31852. 1994.

COSTA, C. **Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales**. Em: Martin-Piera F, Morrone JJ E Melic A (eds). Hacia un Proyecto CYTED para el Inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica en Iberoamérica: PrIBES-2000. Monografías Tercer Milenio 1:99-114. 2000.

COSTA, C. M. Q.; BARRETO, J. W e MOURA, R. C. **Changes in the dung beetle community in response to restinga forest degradation**. Journal of Insect Conservation 18:895-902. 2014.

COSTA, R. G. C. **Dinâmica Evolutiva de Elementos Transponíveis em *Dichotomius (Luederwaldtinia) schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae)**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco - Brasil. 2018.

CUADRADO, A e JOUVE, N. **Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale***. J. Hered. 93:339–345. 2002.

DOVER, G **Molecular drive: a cohesive mode of species evolution**. Nature 299:111-117. 1982.

DOVER, G. **Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated**. Trends in Genetics 2:159-165. 1986.

FELICIELLO, I. et al. **Satellite DNA as a Driver of Population Divergence in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum***. Genome Biology and Evolution 19:7(1):228-39. 2014.

FELICIELLO, I.; AKRAP, I e UGARKOVIC, D. **Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress**. Heredity 11:8:1005466. 2015.

FERREE, P. M e BARBASH, D. A. **Species-Specific Heterochromatin Prevents Mitotic Chromosome Segregation to Cause Hybrid Lethality in *Drosophila***. PLoS Biol 7(10): e1000234. 2009.

FERREE, P. M. **Sex Differences: Satellite DNA Directs Male-Specific Gene Expression**. Current Biology 27:R378–R397. 2017.

RUIZ-RUANO, F. J. et al. **High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats**. Chromosoma. 2018.

FRY, K e SALSER, W. **Nucleotide sequence of HS-a satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterisation of similar sequences in other rodents**. Cell 12: 1069–1084. 1977.

GARRIDO-RAMOS, M. A. **Satellite DNA: An Envolving Topic (Review)**. Genes 8:230. 2017.

GÉNIER, F. **Le genre *Eurysternus* Dalman, 1824 (Scarabaeidae: Scarabaeinae: Oniticellini) révision taxonomique et clés de détermination illustrées.** Pensoft Press, Sofia, Bulgaria. 2009.

GIOVANNOTTI, M. et al. **Isolation and Characterization of Two Satellite DNAs in Some Iberian Rock Lizards (Squamata, Lacertidae).** Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 322(1):13-26. 2014.

HALFFTER, G e MATTHEWS, E. G. **The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae).** Folia Entomológica Mexicana 12-14:1-308. 1966.

HALFFTER, G. **Historical and ecological factors determining the geographical distribution of beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae).** Folia Entomológica Mexicana 8:195-238. 1991.

HANSKI, I e CAMBEFORT, Y. **Dung Beetle Population Biology.** Em: Dung beetles ecology. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, p. 36-50. 1991.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K e MALIK, H. S. **The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA.** Epigenetics 29:1098-2102. 2001.

IUCN. **Red List Categories and Criteria 3.1** (2<sup>o</sup> ed). 2001.

JAGANNATHAN, M. et al. **Comparative Analysis of Satellite DNA in the *Drosophila melanogaster* Species Complex.** Gene Genomics Genetics (G3) 7:693-704. 2017.

JAGANNATHAN, M.; CUMMINGS, R e YAMASHITA, Y. M. **A conserved function for pericentromeric satellite DNA.** eLife 7:e34122. 2018a.

JAGANNATHAN, M e YAMASHITA, Y. M. **Function of Junk: Pericentromeric Satellite DNA in Chromosome Maintenance.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol pii: 034504. 2018b.

JOHN, B e MIKLOS G. L. **Functional Aspects of Satellite DNA and Heterochromatin.** International Review of Cytology 58:1-114. 1979.

JOHN, B. et al. **Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers.** Chromosoma 91:185–200. 1985.

JUAN C.; PONS, J e PETIPIERRE, E. **Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent in situ hybridization.** Chromosome Research 1:167-174. 1993.

JUNIER, T e PEGNI, M. **Dotlet: diagonal plots in a web browser.** Bioinformatics 16(2):178-9. 2000.

KING, L. M e CUMMINGS, M. P. **Satellite DNA Repeat Sequence Variation is Low in Three Species of Burying Beetles in the Genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae).** Molecular Biology and Evolution 14(11):1088-1095. 1997.

- KOLLER, W. W. et al. **Besouros Coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) Coletados em Campo Grande, MS, Brasil.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 28(3):403-412. 1999.
- KUHN, G. C. S. **Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*.** Heredity 115:1–2. 2015.
- 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 Evolutionary Biology 14:233. 2014.
- LAWRENCE, J e NEWTON, A. F. **Evolution and classification of beetles.** Annual Review of Ecology and Systematics 13:261–290. 1982.
- LIAO, D. **Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications.** American Journal of Human Genetics 64:24-30. 1999.
- LOHE, A. R e BRUTLAG, D. L. **Multiplicity of satellite DNA sequences in *Drosophila melanogaster*.** Proc. Nati. Acad. Sci 83:696-700. 1986.
- LONG, E. O e DAWID, I. B. **Repeated Genes in Eukaryotes.** Annual Review of Biochemistry 49:726-764. 1980.
- LÓPEZ-FLORES, I e GARRIDO-RAMOS, M. A. **The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes.** Em: Garrido-Ramos MA (ed) Repetitive DNA. Genome Dynamics 7:1-28. 2012.
- LORITE, P. et al. **Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae).** Genetica 110:143-150. 2001.
- LORITE, P. et al. **Comparative study of satellite DNA in ants of the Messor genus.** Gene 297:113-122. 2002.
- LORITE, P. et al. **Isolation and characterization of two families of satellite DNA with repetitive units of 135 bp and 2.5 kb in the ant *Monomorium subopacum*.** Cytogenetic and Genome Research 105:83-82. 2004.
- LORITE, P; TORRES, M. I e PALOMEQUE, T. **Characterization of two unrelated satellite DNA families in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae).** Buletin of Entomological Research 103(5):538-546. 2013.
- LOUZADA, J. N. C e VAZ-DE-MELLO, F. Z. **Scarabaeidae (Coleoptera, Scarabaeoidea) atraídos por ovos em decomposição em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.** Caldasia 19(3):521-522. 1997.

- LOUZADA, S. **A novel satellite DNA sequence in the *Peromyscus* genome (PMSat): Evolution via copy number fluctuation.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92:193-203. 2015.
- MESTROVIC, N. **Evolution of Satellite DNAs from the genus *Polarus* - Experimental Evidence for the "Library" Hypothesis.** *Molecular Biology and Evolution* 15(8):1062-1068. 1998.
- MILANI, D et al. **The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*.** *BMC Genetics* 18:81.
- MONTREUL, O. **Analyse phylogénétique et paraphylie des Coprini et Dichotomiini (coleoptera: Scarabaeidae). Scénario Biogéographique.** *Ann. la Société Entomol. Fr.* 34: 135–148. 1998.
- MRAVINAC, B. **Long Inversely Oriented Subunits Form a Complex Monomer of *Tribolium brevicornis* Satellite DNA.** *Journal of Molecular Evolution* 60:513-525. 2005.
- MRAVINAC, B e PLOHL, M. **Parallelism in Evolution of Highly Repetitive DNAs in Sibling Species.** *Molecular Biology and Evolution* 27(8):1857-1867. 2010.
- NAVAJAS-PERÉZ, R. et al. **Effect of location, organization and repeat-copy number in satellite-DNA evolution.** *Mol. Genet. Gen.* 282:395–406. 2009.
- MESTROVIC, N et al. **Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs.** *Chromosome Res* 23(3):583-96. 2015.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P e MACAS, J. **Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data.** *BMC Bioinformatics* 11:378:1-12. 2010.
- NOVÁK, P. et al. **RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads.** *Bioinformatics* 29(6):792-793. 2013.
- OHNO, S. **So much “junk” DNA in our genome.** *Brookhaven Symposia in Biology* 23:366-70. 1972.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M. et al. **High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*.** *Scientific Reports* 7(1):6422. 2017.
- PALOMEQUE, T. **Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae).** *Chromosome Research* 13:795-807. 2005.
- PALOMEQUE, T e LORITE, P. **Satellite DNA in insects: a review.** *Heredity* 100:564-573. 2008. 2008.

PAVLEK, M. et al. **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 Research 1-15. 2015.

PEZER, Z et al. **Transcription of Satellite DNAs in Insects.** Progress in Molecular and Subcellular Biology 51:161-78. 2011.

PLOHL, M. et al. **Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*.** Genome 36:467-475. 1993.

PLOHL, M e UGARKOVIC, D. **Characterization of Two Abundant Satellite DNAs from the Mealworm *Tenebrio obscurus*.** Journal of Molecular Evolution 39:489-495. 1994.

PLOHL, M. et al. **Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin.** Gene 409:1–2:72–82. 2008.

PLOHL, M. **Those mysterious sequences of satellite DNAs.** Periodicum Biologorum 112(4):403-410. 2010.

PLOHL, M.; MESTROVIC, N e MRAVINAC, B. **Satellite DNA Evoution. Em: Garrido Ramos MA (ed): Repetitive DNA.** Genome Dynamics 7:126-152. 2012.

PONS, J. et al. **Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): random differential amplification from a common ‘satellite DNA library.** Heredity 92:418-427. 2004.

RIBEIRO, T. et al. **Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans.** Protoplasma 254:2:791-801. 2016.

RICHARD, G. F.; KERREST, A e DUJON, B. **Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes.** Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 72:4:686–727. 2008.

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

RUIZ-RUANO, F. J. et al. **Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumary (B) chromosome.** Chromosoma (in press) DOI: 10.1007/s00412-016-0611-8. 2016b.

RUIZ-RUANO, F. J. et al. **High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats.** Chromosoma 127(3):323-340. 2018.

- SAMOLUK, S. S. et al. **Evolutionary dynamics of an at-rich satellite DNA and its contribution to karyotype differentiation in wild diploid *Arachis* species.** Mol Genet Genomics 292(2):283-296. 2016.
- SAPHIRO, J. A e STERNBERG, R. **Why repetitive DNA is essential to Genome function.** Biological Reviews 80:2:227-250. 2005.
- SATOVIC, E e PLOHL, M. **Tandem repeat-containing MITEs in the clam *Donax trunculus*.** Genome Biol Evol 5:2549–59. 2013.
- SATOVIC, E. et al. **Adjacent sequences disclose potential for intra-genomic dispersal of satellite DNA repeats and suggest a complex network with transposable elements.** BMC Genomics 7:997. 2016.
- SCALI, V e TINTI, F. **Satellite DNA variation in parental and derived unisexual hybrids of *Bacillus* stick insects (Phasmatodea).** Insect Molecular Biology 8(4):557-564. 1999.
- SCHMIDT, T e HESLOP-HARRISON, J. S. **Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes.** Trends in plant science 3:5. 1998.
- SCHWEIZER, D e LOIDL, J. **A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns.** In Chromosomes Today; Hayman DL, Rofe, RH, Sharp, PJ. 9:61–74. 1987.
- SILVA, G. M. et al. **Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae).** Genetics and Molecular Biology 32(2):276-280. 2009.
- SINGER, M. F. **Highly repeated sequences in mammalian genomes.** International Review of Cytology 76: 67–112. 1982.
- SMITH, G. P. **Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover.** Science 191:528–535. 1976.
- SOLA-CAMPOY, P. J. et al. **The Molecular Cytogenetic Characterization of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Suggests the Arrest of Recombination in the Largest Heteropycnotic Pair HC1.** PLoS ONE 10(12):e0143861. 2015.
- SUMNER, A. T. **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** Exp Cell Res 75:304–306. 1972.
- UGARKOVIC, D. **Functional elements residing within satellite DNAs.** EMBO Reports 6: 1035–1039. 2005.
- UGARKOVIC, D.; DURAJILIJA, S e PLOHL, M. **Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) Satellite DNA through DNA Inversion and Insertion.** Journal of Molecular Evolution 42(3):350-358. 1996.
- UGARKOVIC, D e PLOHL, M. **Variation in satellite DNA profiles – causes and effects.** The EMBO Journal 21(22):5955-5959. 2002.

VALOIS, M. C.; VAZ-DE-MELLO, F. Z. e SILVA, F. B. A. **Taxonomic revision of the *Dichotomius sericeus* (Harold, 1867) species group (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae).** Zootaxa 4277 (4): 503–530. 2017.

VAZ-DE-MELLO, F. Z. **Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) de un Fragmento de Floresta Amazônica no Estado do Acre, Brasil. 1. Taxocenose.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 28(3):447-453. 1999.

VAZ-DE-MELLO, F. Z. **Estado de conhecimento dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil.** Em: Martin-Pierra F, Morrone JJ e Melic A (eds). Hacia um Proyecto CYTED para el Inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica em Iberoamérica: PRIBES-2000, m3m - Monografías Tercer Milenio 1:183-195. 2000.

VAZ-DE-MELLO, F. Z. **Revisión Taxonómica y Análisis Filogenético de la Tribu Ateuchini (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae).** Tese (Doutorado em Ciências – Área Sistemática). Departamento de Biodiversidad y Ecología Animal, Instituto de Ecología, A.C. 1-238. 2007.

VAZ-DE-MELLO, F. Z. **Scarabaeidae.** (consulted in <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/126713>). 2017.

VAZ-DE-MELLO, F. Z.; LOUZADA, J. N. C. e GAVINO, M. **Nova espécie de *Dichotomius* Hope, 1838 (Coleoptera: Scarabaeidae) do Espírito Santo, Brasil.** Revista Brasileira de Entomologia 45(2):99-102. 2001.

VAZ-DE-MELLO, F. Z e LOUZADA, J. N. C. ***Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Melo, Louzada & Gavino, 2001**, p.367-368. In Machado ABM, Martins CS, Drummond GM (eds) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Vol 1. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 511p. 2008.

VIEIRA, L. **Degradação da vegetação de Restinga Litorânea: Implicações para a comunidade de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) e conservação da espécie ameaçada *Dichotomius schiffleri*.** Tese. Universidade Federal de Lavras, MS, Brasil. 2008.

VIEIRA, L. et al. **New records, threatens and conservation status for *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada & Gavino (Coleoptera: Scarabaeidae): an endangered dung beetle species from Brazilian atlantic forest ecosystems.** Neotropical Entomology 40(2):282-284. 2011.

VIEIRA, M. L. C. et al. **Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful.** Genetics and Molecular Biology 39:3: 312-328. 2016.

VITTORAZZI, S. E. **Caracterização Citogenética e Molecular do DNA 5S e sua forma variante de DNA Satélite em espécies do grupo de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae).** Tese de doutorado - Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2014.



WALKER, P. M. B. **Origin of Satellite DNA.** Nature 229: 306 - 308. 1971.

XAVIER, C. **Mapeamento físico de sequências de DNAs repetidos e análise do transposon *MarMITE* no genoma de *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae).** Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. 1-79. 2013.

XAVIER, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C e MOURA, R. C. **Heterochromatin and molecular characterization of *DsmarMITE* transposable element in the beetle *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae).** Genetica 142:575-581. 2014.

## ANEXO A - PRIMERS

**Tabela A1.** Primers desenhados para amplificação das diferentes famílias de DNAsat.

| <b>Primer</b>  | <b>Sequência</b>                                       | <b>TM °C</b> |
|----------------|--------------------------------------------------------|--------------|
| DscSat01-224_F | 5' - CATTAATATTGGTTTATTACGTCA - 3'                     | 49.9 °C      |
| DscSat01-224_R | 5' - TTAATAAGCGGTAAACADYGT - 3'                        | 50.1 °C      |
| DscSat02-170_F | 5' - GTATTTTCAGCCATAACTAGTGAT - 3'                     | 50.2 °C      |
| DscSat02-170_R | 5' - GTTTATTAGCTTAAAACAGGCC - 3'                       | 50.0 °C      |
| DscSat03-30_F  | 5' - GCTAATATACGTTAATTAGCAC - 3'                       | 46.9 °C      |
| DscSat03-30_R  | 5' - CTTTATTAGTGCTAATTAACGT - 3'                       | 46,2 °C      |
| DscSat04-148_F | 5' - TACAAACGATTGTCTATCGAACTG - 3'                     | 57.2 °C      |
| DscSat04-148_R | 5' - CCCGTTTGTACCACTTTTCG - 3'                         | 58.9 °C      |
| DscSat05-38_F  | 5' - AATATTCTAAATATATCTTAATTT - 3'                     | 50.0 °C      |
| DscSat05-38_R  | 5' - CTTTAAAAAATTAAGATATATTT - 3'                      | 50.0 °C      |
| DscSat07-76_F  | 5' - CCGATTTTATACTGATCCGAGCT - 3'                      | 59.4 °C      |
| DscSat07-76_R  | 5' - AATCACTCTAACCGGCGCTATT - 3'                       | 59.9 °C      |
| DscSat09-28_F  | 5' - ATAGGTGAAATCGAATAAGA - 3'                         | 45.7 °C      |
| DscSat09-28_R  | 5' - ATGTGTTAATTCTTATTCGATT - 3'                       | 45.8 °C      |
| DscSat10-22_F  | 5' - TGTCTGACTCGATAATACAA - 3'                         | 47.9 °C      |
| DscSat10-22_R  | 5' - AATTGTATTATCGAGTCAGAC - 3'                        | 47.3 °C      |
| DscSat11-27_F  | 5' - CTCTTCTCTCCACCATCCTCCT - 3'                       | 57.5 °C      |
| DscSat11-27_R  | 5' - AGTCCAGGAGGATGGTGGA - 3'                          | 57.6 °C      |
| DscSat12-24_F  | 5' - GAGACGAGAAGGGAAAGAAA - 3'                         | 51.8 °C      |
| DscSat12-24_R  | 5' - TCTGTTTCTTTCCCTTCTCG - 3'                         | 52.0 °C      |
| DscSat13-21_F  | 5' - ATATTTAATATTAATTCTTTT - 3'                        | 46.0 °C      |
| DscSat13-21_R  | 5' - AAAAGAATTAATATTAATATA - 3'                        | 46.0 °C      |
| DscSat14-19_F  | 5' - AATACAAGATACGAGGGCAA - 3'                         | 51.1 °C      |
| DscSat14-19_R  | 5' - TGCCCTCGTATCTTGTATTT - 3'                         | 51.1 °C      |
| DscSat15-22_F  | 5' - AAAATGAAGATAAGAAAAGT - 3'                         | 48.0 °C      |
| DscSat15-22_R  | 5' - TTAATTTTCTTATCTTCATT - 3'                         | 48.0 °C      |
| DscSat16-57_F  | 5' - GGAAGTAACTTCTTAAGATG - 3'                         | 45.3 °C      |
| DscSat16-57_R  | 5' - GTCTTAAGAAGTTACCCCCG - 3'                         | 52.4 °C      |
| DscSat17-41_F  | 5' - GCCATCTTAAGAAGTTACC - 3'                          | 47.7 °C      |
| DscSat17-41_R  | 5' - GGTGGTAACTTCTTAAGATG - 3'                         | 47.8 °C      |
| DscSat18-22_F  | 5' - TTAAGATGGCCGTGGTAACT - 3'                         | 53.7 °C      |
| DscSat18-22_R  | 5' - GAAGTTACCACGGCCATC - 3'                           | 53.3 °C      |
| DscSat19-20_F  | 5'-<br>GGATGGTAACTTCTTAAGATGGATGGTAACTTCTTA<br>AGAT-3' | 60.0 °C      |
| DscSat19-20_R  | 5'-<br>ATCTTAAGAAGTTACCATCCATCTTAAGAAGTTACC<br>ATCC-3' | 60.0 °C      |
| DscSat20-21_F  | 5' - AAAGTTTAGATAAGAAATAT - 3'                         | 46.0 °C      |
| DscSat20-21_R  | 5' - TATATTTCTTATCTAAACTT - 3'                         | 46.0 °C      |

|               |                                                        |         |
|---------------|--------------------------------------------------------|---------|
| DscSat21-33_F | 5' - CTTACTTTAGTTGAGAGTTAATT - 3'                      | 46.1 °C |
| DscSat21-33_R | 5' - ATCTCGACAAAATTA ACTCT - 3'                        | 46.1 °C |
| DscSat22-13_F | 5' - ATAGAAAATAGGTATAGAAAATAGGT - 3'                   | 47.6 °C |
| DscSat22-13_R | 5' - ACCTATTTTCTATACCTATTTTCTAT - 3'                   | 47.6 °C |
| DscSat23-15_F | 5' - AATATTGATTTAATTAATATTGATTTAATT - 3'               | 45.1 °C |
| DscSat23-15_R | 5' - AATTAAATCAATATTAATTAATCAATATT - 3'                | 45.1 °C |
| DscSat24-18_F | 5' -<br>ACGTCAATGTCAATGTCAACGTCAATGTCAATGTCA<br>- 3'   | 62.7 °C |
| DscSat24-18_R | 5' -<br>TGACATTGACATTGACGTTGACATTGACATTGACGT<br>- 3'   | 62.7 °C |
| DscSat25-12_F | 5' - ATTGACGTTGACATTGACGTTGAC - 3'                     | 56.1 °C |
| DscSat25-12_R | 5' - GTCAACGTCAATGTCAACGTCAAT - 3'                     | 56.1 °C |
| DscSat26-20_F | 5'-<br>GAAAATAACAAAGCACATACGAAAATAACAAAGCAC<br>ATAC-3' | 59.0 °C |
| DscSat26-20_R | 5'-<br>GTATGTGCTTTGTTATTTTCGTATGTGCTTTGTTATT<br>TTC-3' | 59.0 °C |