

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Estudo citogenômico de DNA satélites em abelhas das tribos Meliponini e
Bombini: uma perspectiva evolutiva**

Zulemara Boldrini Manhago Vignati
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

ZULEMARA BOLDRINI MANHAGO VIGNATI

Estudo citogenômico de DNA satélites em abelhas das tribos Meliponini e Bombini: uma perspectiva evolutiva

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Denilce Meneses Lopes

Coorientadores: Mara Garcia Tavares
Gisele Amaro Teixeira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V679e
2025
Vignati, Zulemara Boldrini Manhago, 1985-
Estudo citogenômico de DNA satélites em abelhas das
tribos Meliponini e Bombini / Zulemara Boldrini Manhago
Vignati. – Viçosa, MG, 2025.
1 tese eletrônica (93 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Denilce Meneses Lopes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.376>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas - Citogenética. 2. Genômica.
3. Heterocromatina. I. Lopes, Denilce Meneses, 1978-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 572.8

ZULEMARA BOLDRINI MANHAGO VIGNATI

Estudo citogenômico de DNA satélites em abelhas das tribos Meliponini e Bombini: uma perspectiva evolutiva

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de março de 2025.

Assentimento:

Zulemara Boldrini Manhago Vignati
Autora

Denilce Meneses Lopes
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 30/05/2025 às 10:53:56 e pela orientadora em 02/06/2025 às 19:40:31. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **9ABJ.SH74.LHHR** e clique no botão 'Validar documento'.

A minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por ter me sustentado durante essa jornada.

À minha família por todo o apoio que recebi, especialmente ao meu marido, Rodrigo, e dos meus filhos, Alice e Gustavo.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro.

À minha orientadora, professora Denilce Lopes Meneses, por toda paciência, ensinamentos e, acima de tudo, por ter aceitado me orientar, apesar de todas as minhas limitações.

À minha coorientadora, Gisele Amaro. Que pessoa fenomenal! Serei eternamente grata por toda orientação, apoio e incentivo.

Ao professor Vander Calmon Tosta, por todos os ensinamentos, disponibilização do laboratório e apoio nas coletas.

Aos componentes da banca, Natália, Vanessa e Wellington.

A todas as pessoas que abriram as portas de suas casas para me acolher nas inúmeras vezes que fui a Viçosa: Tia Angélica, Tia Beatriz, Tia Imaculada e Rodrigo. Tia Beatriz, você é uma inspiração para mim!

A todos os colegas dos laboratórios de Citogenética de Insetos e Biologia Molecular da UFV.

Aos colegas do laboratório Labelhas da UFES/CEUNES, que sempre me acolheram e ajudaram, especialmente ao João Vitor, presença essencial nas coletas.

À Jaqueline, que me deu as primeiras orientações que possibilitaram algumas análises realizadas neste trabalho.

A todas as pessoas que conheci e às amizades que fiz durante esses quatro anos.

Aos meus alunos, motivo da minha busca por ser uma professora melhor a cada dia.

Aos meus colegas de trabalho, que me incentivaram em meio ao cansaço de uma vida de estudante e professora.

As minhas amigas, que sempre me apoiaram, não vou citar nomes porque tenho a sorte de ter muitas.

Àquelas pessoas que, mesmo sem me conhecer, foram essenciais para que eu conseguisse concluir esta pesquisa, em especial à Cláudia e ao Charles.

A todas as abelhinhas que perderam a vida para que esta pesquisa se realizasse.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Secretaria Estadual de Educação do Estado do Espírito Santo (SEDU),

pela concessão da licença que possibilitou a conclusão do curso.

Todas as vezes que pensei em desistir, essa lista passou pela minha cabeça e foi o motivo para eu prosseguir.

"Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)."

“Estou fascinado com a ideia de que a genética é digital. Um gene é uma longa sequência de letras codificadas, como informações do computador. A biologia moderna está se tornando muito mais um ramo da tecnologia da informação.”

(Richard Dawkins)

RESUMO

VIGNATI, Zulemara Boldrini Manhago, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2025. **Estudo citogenômico de DNA satélites em abelhas das tribos Meliponini e Bombini: uma perspectiva evolutiva.** Orientadora: Denilce Meneses Lopes. Coorientadores: Mara Garcia Tavares e Gisele Amaro Teixeira.

A heterocromatina é rica em sequências repetitivas, como DNA satélite (satDNA) e elementos transponíveis. As novas ferramentas de bioinformática têm auxiliado na identificação dessas sequências, permitindo um estudo mais detalhado de suas características. Aliando ferramentas da bioinformática, como o RepeatExplorer2, às técnicas de citogenética molecular, como a Hibridização in situ Fluorescente (FISH), avaliamos espécies das tribos Meliponini e Bombini com o objetivo de ampliar o entendimento sobre o papel e a evolução dessas sequências nesses grupos. Estudos recentes com Meliponini mostraram que a heterocromatina é constituída por uma família de satDNA que predomina sobre os outros satélites. Devido a isso, as análises de citogenética molecular foram feitas utilizando o satDNA mais abundante como referência. No Capítulo I, realizamos uma análise citogenômica de *Frieseomelitta varia* e avaliamos o compartilhamento do satDNA mais abundante dessa espécie com outras do mesmo gênero e de 13 gêneros adicionais de Meliponini. Nosso objetivo foi caracterizar o satelitoma de *F. varia* e verificar se seu satDNA mais abundante é compartilhado com outras abelhas. Constatamos que o satDNA FvraSat01-306 é o mais abundante no genoma de *F. varia* e está presente em 10 das 17 espécies analisadas, localizando-se principalmente na região centromérica. No Capítulo II, sequenciamos e analisamos o genoma de quatro espécies do gênero *Partamona* para caracterizar seus satelitomas e compreender como o satDNA mais abundante está distribuído nos cromossomos. Também investigamos sua participação na constituição dos cromossomos B de *P. helleri* em diferentes populações, buscando contribuir para o entendimento da origem e composição desses cromossomos, bem como para esclarecer as relações filogenéticas do grupo. Verificamos que, qualitativamente, os genomas das espécies de *Partamona* são semelhantes, mas quantitativamente, espécies do clado A apresentam menor teor de satDNA em comparação às do clado B. Além disso, nossas análises mostraram que o satDNA PartamonaSat01-316 ocupa principalmente as regiões de heterocromatina centromérica e pericentromérica, sendo o principal constituinte dos cromossomos B observados em algumas populações. No Capítulo III, analisamos o satelitoma de seis espécies do gênero *Bombus*, com o objetivo de

caracterizá-lo e verificar se a biblioteca dessas espécies de *Bombus* segue os padrões observados em Meliponini. Nossos resultados mostraram que o satelitoma das espécies de *Bombus* contém 100 famílias de satDNAs, sendo a maioria compartilhada entre as seis espécies. A maioria desses satDNAs possui mais de 50% de AT, sendo os maiores percentuais de AT observados entre os não compartilhados. Em geral, o satelitoma é composto predominantemente por uma família de satDNA e a variação na biblioteca de uma espécie se dá mais em termos quantitativos do que qualitativos uma vez que a maioria dos satDNA são compartilhados.

Palavras-chave: Genoma; DNA repetitivo; RepeatExplorer; Citogenética

ABSTRACT

VIGNATI, Zulemara Boldrini Manhago, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2025. **Cytogenomic study of satellite DNA in bees of the tribes Meliponini and Bombini: an evolutionary perspective.** Adviser: Denilce Meneses Lopes. Co-advisers: Mara Garcia Tavares and Gisele Amaro Teixeira.

Heterochromatin is rich in repetitive sequences such as satellite DNA (satDNA) and transposable elements. New bioinformatics tools have facilitated the identification of these sequences, allowing for a more detailed study of their characteristics. By combining bioinformatics tools, such as RepeatExplorer2, with molecular cytogenetics techniques like Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), we analyzed species from the Meliponini and Bombini tribes to expand our understanding of the role and evolution of these sequences within these groups. Recent studies on Meliponini have shown that heterochromatin is composed of a dominant satDNA family that prevails over other satellite sequences. Consequently, molecular cytogenetic analyses were performed using the most abundant satDNA as a reference. In Chapter I, we conducted a cytogenomic analysis of *Frieseomelitta varia* and evaluated the sharing of its most abundant satDNA with other species of the same genus and with 13 additional genera of Meliponini. Our goal was to characterize the satellitome of *F. varia* and determine whether its most abundant satDNA is shared among other bee species. We found that FvraSat01-306 is the most abundant satDNA in the genome of *F. varia* and is present in 10 out of the 17 species analyzed, predominantly located in the centromeric region. In Chapter II, we sequenced and analyzed the genome of four species from the genus *Partamona* to characterize their satellitomes and understand how their most abundant satDNA is distributed across chromosomes. We also investigated its role in the composition of B chromosomes in *P. helleri* from different populations, aiming to contribute to the understanding of the origin and structure of these chromosomes, as well as to clarify the phylogenetic relationships within the group. We observed that, qualitatively, the genomes of *Partamona* species are similar; however, quantitatively, species from clade A have a lower satDNA content compared to those from clade B. Furthermore, our analyses revealed that PartamonaSat01-316 is primarily located in centromeric and pericentromeric heterochromatin regions and is the main constituent of the B chromosomes observed in some populations. In Chapter III, we analyzed the satellitome of six species from the genus *Bombus* with the aim of characterizing it and assessing whether their satDNA library follows patterns observed in Meliponini. Our results showed that the satellitome of

Bombus species comprises 100 satDNA families, most of which are shared among the six species. The majority of these satDNAs have an AT content above 50%, with the highest AT percentages found in the non-shared families. Overall, the satellitome is predominantly composed of a single satDNA family, and variation within a species library occurs more at the quantitative than qualitative level, since most satDNAs are shared among species.

Keywords: Genome; Repetitive DNA; RepeatExplorer; Cytogenetics.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 12 |
| 1.1 Heterocromatina..... | 12 |
| 1.2 DNA repetitivo | 13 |
| 1.3 DNA satélite | 14 |
| 1.4 Meliponini..... | 17 |
| 1.5 Bombini | 20 |
| REFERÊNCIAS | 23 |
| 2 CAPÍTULO 01: CYTOGENOMICS OF <i>Frieseomelitta varia</i> (HYMENOPTERA: APIDAE) AND THE SHARING OF A SATELLITE DNA FAMILY IN SEVERAL NEOTROPICAL MELIPONINI GENERA..... | 30 |
| 3 CAPÍTULO 02: ANÁLISE DO CITOGENÔMICA DE ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO <i>Partamona</i> SCHWARZ, 1939. | 44 |
| 4 CAPÍTULO 03: ANÁLISE COMPARATIVA DO SATELITOMA DE SEIS ESPÉCIES DE ABELHAS DO GÊNERO <i>Bombus</i> LATREILLE, 1802. | 70 |
| 5 CONCLUSÕES GERAIS | 93 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Heterocromatina

O termo heterocromatina foi proposto por Heitz (1928) para designar o tipo de cromatina que permanece condensada mesmo após a telófase, sendo fortemente corada. Ela é classificada em heterocromatina “facultativa” ou “constitutiva”. A heterocromatina constitutiva (c-heterocromatina) permanece condensada ao longo do ciclo celular, enquanto a heterocromatina facultativa (f-heterocromatina) pode mudar seu estado de condensação em função do estágio de desenvolvimento, em resposta a sinais celulares e à atividade genética (Grewal; Jia, 2007).

A heterocromatina é rica em sequências repetitivas, como DNA satélite, aqui denominado satDNA, e elementos transponíveis. Essa região cromossômica está associada a papéis importantes, como a montagem dos cinetócoros e a correta segregação cromossômica, além da estabilidade genômica, restringindo a atividade de elementos móveis e evitando a recombinação não homóloga de sequências repetitivas durante o reparo do DNA (Saksouk; Simboeck; Déjardin, 2015; Allshire; Madhani, 2018; Penagos-Puig; Furlan-Magaril, 2020).

Em abelhas sem ferrão, a maioria das espécies possui uma grande quantidade de c-heterocromatina localizada ao longo de um dos braços cromossômicos ou até mesmo em quase toda a sua extensão cromossômica (revisão por Tavares; Lopes; Campos, 2017; Cunha *et al.*, 2021; Pereira; Salomão; Lopes, 2020; Pereira *et al.*, 2021b). Além disso, ampliações da heterocromatina foram propostas como responsáveis pela origem de genomas com maiores valores C (quantidade de DNA no genoma nuclear haploide) observados em algumas espécies de Meliponini, destacando o papel da heterocromatina na evolução genômica dessas abelhas (Tavares *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2021).

Ao longo dos últimos anos, estudos citogenéticos moleculares utilizando diferentes metodologias de produção de sondas específicas (microdissecção cromossômica, enzimas de restrição e cinética de renaturação Cot-DNA) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em espécies de gêneros distintos de abelhas sem ferrão permitiram propor os primeiros insights sobre a composição e evolução da heterocromatina em Meliponini (Lopes *et al.*, 2014; Piccoli *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2020; Pereira; Salomão; Lopes, 2020; Pereira *et al.*, 2021a,b; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023). Esses estudos mostraram que a heterocromatina apresenta uma

sequência de DNA repetitivo altamente abundante, que é compartilhada entre os cromossomos da mesma espécie e entre espécies intimamente relacionadas do mesmo gênero, mas não entre gêneros diferentes.

1.2 DNA repetitivo

O genoma de eucariotos apresenta uma grande complexidade. Ele é composto por sequências de cópia única, como a maioria dos genes, e sequências repetitivas, como elementos transponíveis e satDNA (Wagner; Maguire; Stallings, 1993). Em algumas espécies, essas sequências podem representar mais da metade do conteúdo do DNA nuclear (Pereira *et al.*, 2021b; Mora *et al.*, 2023). Apesar de compor uma fração tão importante do genoma, ainda é a porção menos compreendida. Os estudos sobre essas sequências indicam que uma compreensão completa de cada genoma eucariótico só é possível com uma visão detalhada de sua fração repetitiva (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023).

As sequências repetitivas podem ser dispersas ou em tandem (Richard; Kerrest; Dujon, 2008). As repetições dispersas incluem os elementos transponíveis, genes de tRNA e genes parálogos. As repetições em tandem englobam genes em tandem, matrizes de repetição de DNA ribossômico (rDNA) e satDNA, sendo este último subdividido em satélites, minissatélites e microsatélites (Richard; Kerrest; Dujon, 2008). As sequências repetitivas são encontradas preferencialmente em regiões de heterocromatina, onde participam da formação de centrômeros e telômeros, essenciais à manutenção da estrutura cromossômica (Grewal; Jia, 2007). Também atuam na regulação gênica e na dinâmica evolutiva do genoma (Kidwell; Lisch, 2000; Feschotte, 2008).

Algumas sequências repetitivas são fortemente conservadas entre as espécies, em contrapartida, outras estão entre as mais variáveis, podendo apresentar diferenças até entre espécies próximas (Biscotti; Olmo; Heslon-Harrison, 2015). Os estudos das sequências repetitivas em diferentes espécies têm contribuído para a compreensão das mudanças dessas sequências ao longo do tempo e de como elas podem influenciar a evolução do genoma (Pereira; Salomão; Lopes, 2020; Pereira *et al.*, 2021a, 2021b; Teixeira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023).

Com o progresso das metodologias de sequenciamento e a evolução das ferramentas de bioinformática, hoje é possível definir uma coleção de todos os DNAs repetitivos e DNAs satélites em um genoma, o repetitoma e o satelitoma, respectivamente. Essa evolução das ferramentas e o estudo de espécies não modelo têm mostrado que a diversidade e complexidade do satelitoma podem ser maiores do que se supunha inicialmente, reforçando a importância de conhecer melhor essas sequências (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023), uma vez que elas podem representar um elemento-chave para entender os mecanismos e a dinâmica dos rearranjos cromossômicos entre genomas eucariotos (Eichler; Sankoff, 2003).

1.3 DNA satélite

O satDNA apresenta-se no genoma como sequências repetitivas em tandem (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). De acordo com o tamanho dessas sequências, elas podem ser classificadas em microssatélites, minissatélites e satélites, apesar de não haver um consenso a respeito do comprimento (Tautz, 1993; Richard; Kerrest; Dujon, 2008). Segundo Charlesworth, Sniegowski e Stephan (1994), os microssatélites possuem de 1 a 5 pb, os minissatélites \cong 15 pb e os satélites \cong 100 pb. Richard, Kerrest e Dujon (2008) propõem que repetições de 1 a 8 nucleotídeos devem ser tratadas como microssatélites, enquanto repetições de nove ou mais nucleotídeos devem ser chamadas de minissatélites.

O termo DNA satélite é histórico e está relacionado ao fato de essa sequência repetitiva ter sido descoberta como um pequeno pico no perfil de ultracentrifugação de CsCl₇. Experimentos de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério permitiram a primeira identificação dessas sequências. Verificaram-se duas bandas com diferentes densidades, sendo que a banda menos densa representava cerca de 10% do genoma (Kit, 1961; Sueoka, 1961). Por meio da técnica de cinética de reassociação (Cot), constatou-se que essa região apresentava uma taxa de renaturação superior ao restante do DNA genômico, caracterizando sua natureza repetitiva, sendo essa porção denominada satDNA (Waring; Britten, 1966; Britten; Davidson, 1971). Essa técnica para o estudo de sequências repetitivas predominou até por volta de 1980, mas, com o advento de técnicas utilizando enzimas de restrição, foi possível isolar uma sequência repetitiva específica (Hörz; Zachau, 1977).

Posteriormente, essas metodologias foram associadas à Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que permitiu a verificação da localização nos cromossomos, e também à clonagem em vetores e posterior sequenciamento, o que possibilitou conhecer a constituição das sequências repetitivas (Ratan *et al.*, 2017). Mais recentemente, essas metodologias foram complementadas por análises de bioinformática de uma coleção de sequências curtas de DNA produzidas por Sequenciamento de Nova Geração (Novák *et al.*, 2017; Novák, Neumann; Macas, 2020). Apesar disso, o termo satDNA ainda é útil por ser simples, descritivo e amplamente utilizado na literatura, o que levou à proposta do termo “satelitoma” para designar o conjunto dos diferentes DNAs satélites (microssatélites, minissatélites e satélites) de um genoma (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016).

De acordo com a similaridade, os monômeros de satDNA são classificados em variante, família e superfamília (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Espécies relacionadas podem compartilhar um conjunto ou uma biblioteca de sequências de satDNA herdada do ancestral comum, as quais podem evoluir de forma independente, conforme prevê a Hipótese da Biblioteca (Salser *et al.*, 1976). Sendo assim, é possível que, em cada espécie, existam famílias de satDNA predominantes (Garrido-Ramos, 2017), como já observado em espécies dos gêneros *Melipona* e *Trigona* (Pereira *et al.*, 2021b; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023). Os satDNAs estão entre os componentes mais dinâmicos dos genomas eucarióticos, evoluindo rapidamente tanto na sequência quanto na abundância (Garrido-Ramos, 2017; Plohl; Metrovic; Mravinac., 2012). Em função disso, é comum a existência de repetições específicas em gêneros ou mesmo em espécies (Macas *et al.*, 2010) e até mesmo sequências específicas de cromossomos (Montiel *et al.*, 2022).

O satDNA, apesar de representar um componente importante dos genomas de eucariotos, ainda é pouco conhecido e sub-representado em projetos de sequenciamento e montagem de genoma inteiro (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Devido à homogeneidade das sequências repetitivas do satDNA, sua montagem representa um desafio, e muitas vezes essas sequências são removidas durante a análise (Biscotti *et al.*, 2005; Vitales; Garcia; Dodsworth, 2020; Paula-Freitas *et al.*, 2020).

As ferramentas de bioinformática disponíveis geralmente exigem a montagem completa dos genomas sequenciados, o que torna a caracterização de sequências repetitivas um desafio. Contudo, novas abordagens computacionais têm auxiliado na identificação dessas sequências, como o pipeline *RepeatExplorer2*, cujo protocolo se fundamenta na identificação e

clusterização de reads semelhantes geradas por sequenciamento de nova geração, cortadas aleatoriamente. Gráficos são gerados a partir dessas semelhanças entre as *reads*, e sua topologia é analisada com o objetivo de identificar sequências repetitivas (Novák *et al.*, 2017; Novák, Neumann; Macas, 2020).

O avanço dessa técnica tem permitido estudos com sequências repetitivas em diversos grupos, como insetos (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018; Milani *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019; Bardella; Milani; Cabral-de-Melo, 2020; Mora *et al.*, 2020, 2023; Pereira *et al.*, 2021b; Lima *et al.*, 2022; Camacho *et al.*, 2022; Montiel *et al.*, 2022; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023), plantas (Fu *et al.*, 2019), mamíferos (Paço *et al.*, 2015) e anfíbios (Silva *et al.*, 2020). Dados sobre a abundância e similaridade de sequências repetidas têm fornecido resultados importantes, inclusive para a reconstrução de filogenias (Dodsworth *et al.*, 2015; Vitales; Garcia; Dodsworth, 2020). Em espécies com cromossomos B, o uso de sequências repetitivas para determinar a ancestralidade e descrever a composição desses cromossomos tem contribuído para a compreensão de sua origem e história evolutiva (Milani *et al.*, 2018).

Embora o satDNA tenha sido tradicionalmente considerado "DNA lixo", algumas possíveis funções foram sugeridas ao longo dos últimos anos, incluindo estudos que analisam a atividade e a dinâmica transcricional do satDNA, que, anteriormente, era considerado uma porção inativa do genoma (Ver revisão de Cabral-De-Mello; Palacios-Gimenez, 2024). As matrizes de satDNA, apesar de serem tradicionalmente encontradas em regiões de heterocromatina centromérica e telomérica dos cromossomos, também têm sido descritas em regiões de eucromatina (Dibartolomeis; Tartof; Jackson, 1992; Kuhn *et al.*, 2012; Pavlek *et al.*, 2015; Milani *et al.*, 2018). Os satDNAs dominantes na eucromatina possuem características estruturais, organizacionais e evolutivas semelhantes às encontradas na heterocromatina (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023). Cromossomos sexuais e supranumerários, que geralmente são altamente heterocromáticos, são ricos em satDNA (Lower *et al.*, 2018; Charlesworth; Sniegowski; Stephan, 1994).

A investigação da atividade de transcrição ou expressão das sequências repetitivas tem proporcionado uma nova perspectiva sobre suas funções. Em insetos, a transcrição do satDNA já foi descrita em diversos grupos, como moscas (Lima; Svartoman; Kuhn., 2017; Mills *et al.*, 2019), mosquitos (Halbach *et al.*, 2020), mariposas (Vechtová *et al.*, 2016), formigas (Lorite *et al.*, 2002), vespas (Renault *et al.*, 1999), besouros (Feliciello *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2017) e grilos (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018). A comparação da natureza, composição, abundância e

localização dessas sequências entre espécies mais e menos relacionadas têm fornecido informações importantes sobre sua evolução e amplificação (Biscotti; Olmo; Heslon-Harrison, 2015; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2021b; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Lima *et al.*, 2022; Anjos *et al.*, 2023).

Ademais, com base nas informações do satelitoma, é possível propor hipóteses de relações evolutivas congruentes com análises sistemáticas baseadas em marcadores de DNA comumente utilizados (Dodsworth *et al.*, 2015; Vitales; Garcia; Dodsworth, 2020). Os satélites apresentam diferenças não apenas em número e abundância, mas também em sua distribuição ao longo do genoma, comprimento, padrões de interdispersão, associação com elementos transponíveis e localização na heterocromatina e/ou na eucromatina (revisado por Šatović-Vukšić; Plohl, 2023).

A revisão de Šatović-Vukšić e Plohl (2023) mostra que as características relacionadas às sequências repetidas em tandem, como número, abundância, organização, distribuição e localização na heterocromatina/eucromatina, representam características independentes entre si. O estudo do satelitoma em um maior número de espécies pode aprofundar o conhecimento dessas sequências e contribuir para uma melhor compreensão de como elas influenciaram a evolução cromossômica das abelhas Meliponini.

1.4 Meliponini

A tribo Meliponini é composta por abelhas sem ferrão, distribuídas em áreas tropicais ou subtropicais (Michener, 2007). Esses organismos desempenham um papel ecológico notável como polinizadores de diversas angiospermas (Roubik *et al.*, 2018). De acordo com a filogenia molecular, a tribo Meliponini é constituída por três clados principais: Afrotropical, Indo-Malaia/Australásia e Neotropical (Rasmussen; Cameron, 2010). O clado Neotropical é representado por 417 espécies, muitas das quais ainda precisam ser descritas (Camargo; Pedro, 2013). Nesse clado, as principais diversificações ocorreram nos últimos 30–40 Ma, sendo subdividido em três grupos: *Trigonisca* (Clado 1), *Melipona* (Clado 2) e os demais Meliponini, que constituem um terceiro grupo (Clado 3) (Rasmussen; Cameron, 2010).

A presença de grande quantidade de heterocromatina nos cromossomos é uma característica marcante das abelhas sem ferrão, podendo, em alguns casos, estender-se por

quase todo o cromossomo (revisão em Tavares *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2021). A amplificação da heterocromatina tem sido sugerida como um fator responsável pelos maiores valores C (quantidade de DNA no genoma nuclear haploide) observados em algumas espécies de Meliponini, evidenciando seu papel na evolução genômica dessas abelhas (Tavares, Lopes e Campos, 2012; Cunha *et al.*, 2021). Além disso, cromossomos B, que geralmente são heterocromáticos, podem influenciar o tamanho do genoma nuclear, mesmo quando são pequenos (Novaes *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, a aplicação de diferentes técnicas de citogenética molecular, com a produção de sondas específicas (microdissecção cromossômica, enzimas de restrição e cinética de renaturação Cot-DNA) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), em espécies de diferentes gêneros de abelhas sem ferrão, proporcionou as primeiras informações sobre a composição e evolução da heterocromatina em Meliponini (Lopes *et al.*, 2014; Piccoli *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2020; Pereira; Salomão; Lopes, 2020; Pereira *et al.*, 2021a). Esses estudos demonstraram que a heterocromatina é rica em uma sequência de DNA repetitiva, compartilhada entre os cromossomos da mesma espécie e entre espécies próximas do mesmo gênero, porém não entre diferentes gêneros estudados. No entanto, essa visão começou a mudar quando Campos *et al.* (em preparação) revelaram, em Meliponini, o compartilhamento de sequências repetitivas na heterocromatina entre os gêneros irmãos *Plebeia* e *Friesella*.

Embora já se soubesse que a heterocromatina de Meliponini era composta predominantemente por sequências repetitivas, foi a integração de dados genômicos, cromossômicos e ferramentas de bioinformática, abordagem conhecida como citogenômica, que permitiu a identificação dessas sequências repetitivas (Pereira *et al.*, 2021b; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025). O primeiro estudo utilizando essa abordagem foi conduzido no gênero *Melipona* e demonstrou que, em *M. scutellaris*, a grande quantidade de heterocromatina observada está associada à amplificação de um determinado satDNA (MscuSat01-195), que corresponde a 38,2% do genoma (Pereira *et al.*, 2021b). Em contrapartida, em *M. quadrifasciata*, espécie do mesmo gênero, mas com baixo teor de heterocromatina, o satDNA mais abundante (MquaSat01-586) representa apenas 0,95% do genoma. Esses resultados foram corroborados pela caracterização do satelitoma de *Trigona hyalinata*, que apresentou um padrão semelhante (Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023). A análise citogenômica revelou que a heterocromatina de *T. hyalinata* também é composta predominantemente por um satDNA altamente abundante (ThyaSat01-301). A comparação entre os dados filogenéticos (Rasmussen & Camargo, 2008) e citogenômicos demonstrou que

esse satDNA é compartilhado com outras espécies do mesmo clado, mas não foi detectado em espécies do clado irmão, revelando uma evolução divergente da heterocromatina nos dois cladros de *Trigona*. Esses estudos indicam que, em *Melipona* e *Trigona*, os eventos evolutivos relacionados à diversificação e amplificação do satelitoma podem refletir a estruturação de cladros filogenéticos nos gêneros de Meliponini (Pereira *et al.*, 2021b; Pereira, Cabral-de-Melo; Lopes, 2023).

Entretanto, dados publicados recentemente sobre Meliponini apontam que um satDNA presente na heterocromatina de diversos gêneros desta tribo pode ser compartilhado. O satDNA FvarSat01-306, de *Frieseomelitta varia*, é compartilhado por espécies de diferentes gêneros de abelhas sem ferrão e localiza-se principalmente na heterocromatina centromérica e pericentromérica. Esses resultados demonstraram que esse satDNA é compartilhado tanto por espécies do mesmo gênero quanto por outras pertencentes a sete gêneros distintos. Além disso, a sonda produzida para esse satDNA, além de hibridizar na heterocromatina de todos os cromossomos do complemento regular, também hibridizou no cromossomo B de *P. helleri* (Vignati *et al.*, 2025).

Os cromossomos B, também chamados de supranumerários, são cromossomos extras ao complemento regular (A), dispensáveis e que seguem suas próprias vias evolutivas, ou seja, possuem um padrão de herança distinto do usual (mendeliano) entre os indivíduos que os carregam, traçando um caminho evolutivo independente (Camacho; Sharbel; Beukeboom, 2000; Camacho, 2005). Em Meliponini, a presença de cromossomos B já foi relatada nos gêneros *Melipona*, *Tetragonisca* e *Partamona* (Lopes *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009, 2014; Tosta *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Novaes *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2023). No gênero *Partamona*, a ocorrência de cromossomos B foi descrita em estudos citogenéticos com *P. cupira*, *P. rustica* e *P. helleri* (Marthe *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2009, 2014; Tosta *et al.*, 2014; Novaes *et al.*, 2021). Dentre essas espécies, *P. helleri* apresenta o maior número e diversidade de cromossomos B já relatados por indivíduo. Martins *et al.* (2014) descreveram dez tipos de cromossomos B em *P. helleri*, sendo que até sete podem estar presentes em um mesmo indivíduo. Novaes *et al.* (2021) relataram a presença de até cinco cromossomos B por indivíduo. Ambos os estudos mostraram que os cromossomos B apresentam tamanhos variados e são essencialmente heterocromáticos, embora contenham uma porção eucromática. Embora normalmente esses cromossomos sejam pequenos e apresentem menor conteúdo de DNA, alguns podem ter tamanho superior ao dos cromossomos do complemento A (Martins *et al.*, 2014), influenciando o tamanho do genoma nuclear (Novaes *et al.*, 2021).

Com o objetivo de compreender melhor a origem e a composição desses cromossomos extras em *P. helleri*, alguns estudos foram conduzidos nessa espécie. Tosta *et al.* (2004) produziram um marcador específico, *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR), que possibilitou a identificação da presença de cromossomos B em indivíduos adultos. Martins *et al.* (2014) realizaram pintura cromossômica utilizando sondas específicas obtidas por microdissecção do cromossomo B1 de *P. helleri*, mas não conseguiram demonstrar a hibridização da sonda B nos cromossomos A dessa espécie, levando-os a propor que esses cromossomos possam ter origem interespecífica, uma vez que a sequência do B não apresentou homologia com o complemento A. Tosta *et al.* (2014) compararam as sequências do marcador SCAR, associado à presença de cromossomos B em quatro espécies de *Partamona* (*P. helleri*, *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica*), e verificaram grande similaridade entre as sequências desse marcador nessas espécies. Essas análises sugerem que os cromossomos B nesse gênero podem ter sido transferidos recentemente por meio de hibridizações interespecíficas (Tosta *et al.*, 2014).

1.5 Bombini

A tribo Bombini representa um dos grupos de abelhas corbiculadas que, de acordo com as filogenias moleculares, tem como grupo irmão as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini (Cameron *et al.*, 2007; Rasmussen; Cameron, 2010; Almeida *et al.*, 2023). Essa tribo é composta pelo gênero *Bombus*, que possui aproximadamente 294 espécies (Williams *et al.* 2023), a maioria dessas encontradas no continente asiático (Williams; Jepsen, 2014). Apesar da ampla distribuição geográfica, essas abelhas apresentam morfologia semelhante ao longo de toda a sua distribuição (Michener, 1990; Williams, 1998) e desempenham um importante papel econômico e ecológico por meio do processo de polinização (Velthuis & Van Doorn, 2006).

Na filogenia do gênero *Bombus* proposta por Cameron *et al.* (2007), esse gênero aparece dividido em 38 subgêneros, sendo a maioria agrupada em dois clados principais: o “*short-faced*” e o “*long-faced*”, que se distinguem principalmente por diferenças associadas à morfologia da cabeça. Contudo, as estimativas dessa filogenia indicam que nem todos os subgêneros seriam monofiléticos. Buscando facilitar o estudo do grupo, Williams *et al.* (2008) propuseram uma simplificação da classificação subgenérica, considerando basicamente os seguintes critérios: monofilia, menor número de subgêneros, possibilidade de identificação com

base na morfologia e nomeação conforme os principais grupos comportamentais e ecológicos. Essa abordagem reduziu o número de subgêneros do gênero *Bombus* para 15.

Dentro do gênero *Bombus*, o número haploide (n) de cromossomos pode variar de 12 a 20, sendo predominante $n = 18$, considerado o número haploide ancestral. Essas variações decorrem de eventos de fissão e fusão cromossômica (Owen; Richards; Wilkes, 1995). Com base em evidências citogenéticas e estados ancestrais, Travenzoli *et al.* (2019) sugerem que o ancestral comum entre Meliponini e Bombini possuía $n = 18$ cromossomos.

Até onde se sabe, o único estudo envolvendo satDNA no gênero *Bombus* foi realizado por Rouleux-Bonnin, Bigot e Bigot (2004), que, utilizando enzimas de restrição descreveram uma família de satDNA em *B. terrestris* com 420 pb, constituída por 57% de bases AT. A divergência média da sequência de ácido nucleico entre cada par de monômeros foi de 11,1%. Além disso, as diferenças observadas nas quantidades de satDNA nos genomas de fêmeas (rainhas e operárias) e machos, foram atribuídas a perdas de DNA cromossômico durante o desenvolvimento dos machos.

A disponibilidade de genomas de diversas espécies do gênero *Bombus* em bancos de dados, como o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), oferece uma oportunidade para estudar e comparar o satDNA dessas espécies, que são morfologicamente semelhantes ao longo de sua ampla distribuição. Embora os genomas montados de diversas espécies de *Bombus* tenham sido publicados recentemente (Saad *et al.*, 2015; Heraghty *et al.*, 2020; Crowley *et al.*, 2023; Koch *et al.*, 2024), a biblioteca de satDNA parece continuar sendo negligenciada nesses projetos, devido a limitações do sequenciamento na recuperação de conteúdo repetitivo. No entanto, torna-se cada vez mais evidente a importância de elucidar o papel do satDNA no genoma dos eucariotos (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023).

Considerando a melhoria na resolução do entendimento da dinâmica e evolução do satDNA, avaliamos espécies das tribos Meliponini e Bombini para compreender o papel dessas sequências nesses grupos. Para isso:

- No **Capítulo I**, realizamos uma análise citogenômica de *Frieseomelitta varia* e avaliamos o compartilhamento do satDNA mais abundante dessa espécie com espécies do mesmo gênero e de outros 13 gêneros de Meliponini. Nosso objetivo foi caracterizar o satDNA de *F. varia* e verificar se o satDNA mais abundante é compartilhado com outros gêneros de abelhas.

- No **Capítulo II**, sequenciamos e analisamos o genoma de quatro espécies do gênero *Partamona* com o intuito de caracterizar o satelitoma e compreender como o satDNA mais abundante está distribuído nos cromossomos dessas espécies, além de sua participação na constituição dos cromossomos B de *P. helleri* em diferentes populações. Nosso objetivo foi fornecer dados que possam contribuir para esclarecer a origem e composição dos cromossomos B, além de fornecer informações adicionais sobre as relações filogenéticas desse grupo.
- No **Capítulo III**, caracterizamos o satelitoma de seis espécies do gênero *Bombus*, em termos de diversidade, abundância e divergência, e analisamos se a biblioteca dessas espécies de *Bombus* segue os padrões observados em Meliponini.

REFERÊNCIAS

- ALLSHIRE, R. C.; MADHANI, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 229-244, 2018.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* The evolutionary history of bees in time and space. **Current Biology**, v. 33, n. 16, p. 3409–3422, 2023.
- ANJOS, A. *et al.* Evolution of satDNAs on holocentric chromosomes: Insights from hemipteran insects of the genus *Mahanarva*. **Chromosome Research**, v. 31, p. 5, 2023.
- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, v. 28, p. 369-380, 2020.
- BISCOTTI, M. A. *et al.* Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 463-477, 2015.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.
- BRITTEN, R. J.; DAVIDSON, E. H. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. **The Quarterly Review of Biology**, v. 46, n. 2, p. 111-138, 1971.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M. Repetitive DNAs: the 'invisible' regulators of insect adaptation and speciation. **Current Opinion in Insect Science**, v. 67, p. 101295, 2024.
- CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2022.
- CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: GREGORY, T. R. (ed.). **The Evolution of the Genome**. San Diego: Elsevier, 2005. p. 223–286.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 355, p. 163–178, 2000.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Eds.). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: março 2025.
- CAMERON, S. A.; HINES, H. M.; WILLIAMS, P. H. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 161–188, 2007.
- CAMPOS, C. L.; TEIXEIRA, G. A.; LOPES, D. M.; WALDSCHMIDT, A. M. Molecular cytogenetics reveals insights into heterochromatin composition and karyotype evolution in species of the Plebeia group (Apidae: Meliponini). **Insectes Soc.**, 2024. (submitted).

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CROWLEY, L.; SIVELL, O.; University of Oxford and Wytham Woods Genome Acquisition Lab et al. The genome sequence of the Tree Bumblebee, *Bombus hypnorum* (Linnaeus, 1758). **Wellcome Open Research**, v. 8, p. 21, 2023.

CUNHA, M. S. *et al.* Supernumerary B Chromosomes of *Tetragonisca fiebrigi* Share Repeat Content with Standard Chromosome Set of both *T. fiebrigi* and *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 163, n. 1-2, p. 52–58, 2023.

CUNHA, M. S. *et al.* Robertsonian rearrangements in Neotropical Meliponini karyotype evolution (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Insect Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 379–389, 2021.

CUNHA, M. S.; CAMPOS, L. A. O.; LOPES, D. M. Insights into the heterochromatin evolution in the genus *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Insectes Soc.**, v. 67, p. 391–398, 2020.

DIBARTOLOMEIS, S. M.; TARTOF, K. D.; JACKSON, F. R. A superfamily of *Drosophila* satellite related (SR) DNA repeats restricted to the X chromosome euchromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 1113–1116, 1992.

DODSWORTH, S. *et al.* Genomic repeat abundances contain phylogenetic signal. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 112–126, 2015.

EICHLER, E. E.; SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosomal evolution. **Science**, v. 301, p. 793-797, 2003.

FELICIELLO, I. *et al.* Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, p. 228–239, 2015.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 397–405, 2008.

FU, J. *et al.* Identification and characterization of abundant repetitive sequences in *Allium cepa*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 16756, 2019.

GARRIDO-RAMOS, M. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.

GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 2007.

HALBACH, R. *et al.* A satellite repeat-derived piRNA controls embryonic development of *Aedes*. **Nature**, v. 580, p. 274–277, 2020.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. I. **Jahrb Wiss Bot**, v. 69, p. 762-818, 1928.

HERAGHTY, S. D. *et al.* De novo genome assemblies for three North American bumble bee species: *Bombus bifarius*, *Bombus vancouverensis*, and *Bombus vosnesenskii*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 8, p. 2585-2592, 2020.

HÖRZ, W.; ZACHAU, H. G. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. **European Journal of Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 383-392, 1977.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 3, p. 95-99, mar. 2000.

KIT, S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 6, p. 711-716, 1961.

KOCH, J. B. U. *et al.* Chromosome-scale genome assembly of the hunt bumble bee, *Bombus huntii* Greene, 1860, a species of agricultural interest. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 14, n. 10, p. jkae160, 2024.

KUHN, G. C. S. *et al.* The 1.688 repetitive DNA of *Drosophila*: Concerted evolution at different genomic scales and association with genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 7–11, 2012.

LIMA, L. G. de; RUIZ-RUANO, F. J. In-depth satellitome analyses of 37 *Drosophila* species illuminate repetitive DNA evolution in the *Drosophila* genus. **Genome Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. evac064, 2022.

LIMA, L. G.; SVARTMAN, M.; KUHN, G. C. Dissecting the satellite DNA landscape in three cactophilic *Drosophila* sequenced genomes. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, p. 2831-2843, 2017.

LOPES, D. M. *et al.* Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 and *Melipona mondury* Smith, 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochrome staining. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 49–52, 2008.

LOPES, D. M. *et al.* Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. **Caryologia**, v. 67, n. 3, p. 222-226, 2014.

LORITE, P. *et al.* Genomic organization and transcription of satellite DNA in the ant *Aphaenogaster subterranea* (Hymenoptera, Formicidae). **Genome**, v. 45, p. 609–616, 2002.

LOWER, S. S. *et al.* Satellite DNA evolution: Old ideas, new approaches. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 49, p. 70–78, 2018.

MACAS, J. *et al.* Global sequence characterization of rice centromeric satellite based on oligomer frequency analysis in large-scale sequencing data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 17, p. 2101-2108, 2010.

MARTHE, Jefferson de Brito *et al.* Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 253-255, 2010.

MARTINS, C. C. C. *et al.* Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. **Apidologie**, v. 44, p. 75-81, 2014.

MARTINS, C. C. C. *et al.* New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 782–785, 2009.

- MICHENER, C. D. The bees of the world. JHU press, 2007.
- MICHENER, C. D. Classification of the Apidae. **University of Kansas Science Bulletin**, v. 54, p. 75–164, 1990.
- MILANI, D. *et al.* Satellite DNAs unveil clues about the ancestry and composition of B chromosomes in three grasshopper species. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 523, 2018.
- MILLS, W. K. *et al.* RNA from a simple-tandem repeat is required for sperm maturation and male fertility in *Drosophila melanogaster*. **eLife**, v. 8, e48940, 2019.
- MONTIEL, E. E. *et al.* Satellitome of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), the most diverse among insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 826808, 2022.
- MORA, P. *et al.* Making the genome huge: The case of *Triatoma delpontei*, a Triatominae species with more than 50% of its genome full of satellite DNA. **Genes**, v. 14, p. 371, 2023.
- MORA, P. *et al.* Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, v. 11, n. 7, p. 783, 2020.
- MORA, P. *et al.* Characterization and transcriptional analysis of a subtelomeric satellite DNA family in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 481–487, 2017.
- NOVAES, C. M. *et al.* Chromosome evolution in the genus *Partamona* (Apidae: Meliponini), with comments on B chromosome origin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 161, n. 10–11, p. 520–528, 2021.
- NOVÁK, P. *et al.* TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. e111, 2017.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3745–3776, 2020.
- OWEN, R. E.; RICHARDS, K. W.; WILKES, A. Chromosome numbers and karyotypic variation in bumble bees (Hymenoptera: Apidae; Bombini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 290–302, 1995.
- PAÇO, A. *et al.* The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 427–440, 2015.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. **DNA Research**, v. 25, p. 137–147, 2018.
- PAULA FREITAS, F. C. *et al.* The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* - a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–26, 2020.

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**, v. 22, p. 387–401, 2015.

PENAGOS-PUIG, A.; FURLAN-MAGARIL, M. Heterochromatin as an Important Driver of Genome Organization. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 8, p. 579137, 2020.

PEREIRA, J.A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The Satellite DNAs Populating the Genome of *Trigona hyalinata* and the Sharing of a Highly Abundant satDNA in *Trigona* Genus. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 418, 2023.

PEREIRA, J.A. *et al.* Molecular cytogenetics in the study of repetitive sequences helping to understand the evolution of heterochromatin in *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Genetica**, v. 149, p. 55-62, 2021a.

PEREIRA, J.A. *et al.* The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, v. 130, p. 251–262, 2021b.

PEREIRA, J.A.; SALOMÃO, T. M. F.; LOPES, D. M. Different repetitive DNA sequences make up heterochromatin in Meliponini. **Apidologie**, v. 51, p. 855-860, 2020.

PICCOLI, M. C. A.; BARDELLA, V. B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): Chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. **Apidologie**, v. 49, p. 497–504, 2018.

PLOHL, M.; METROVIC, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA Evolution. **Repetitive DNA**, p. 126–152, 2012.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, A. S. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 206–232, 2010.

RASMUSSEN, C.; CAMARGO, J. M. A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona s.s.* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 102-118, 2008.

RATAN, Z. A. *et al.* Application of Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. **Cureus**, v. 9, n. 6, p. e1325, 2017.

RENAULT, S. *et al.* Satellite DNA transcription in *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 103–111, 1999.

RICHARD, G. F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 686-727, 2008.

ROUBIK, D. W. (Ed.). The pollination of cultivated plants. A compendium for practitioners. Vols. 1 & 2. Rome: FAO, 324 p., 2018.

- ROULEUX-BONNIN, F.; BIGOT, S.; BIGOT, Y. Structural and transcriptional features of *Bombus terrestris* satellite DNA and their potential involvement in the differentiation process. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 877–888, 2004.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28333, 2016.
- SADD, B. *et al.* The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. **Genome Biology**, v. 16, p. 1-32, 2015.
- SAKSOUK, N.; SIMBOECK, E.; DÉJARDIN, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, p. 1-17, 2015.
- SALSER, W. *et al.* Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. In: **Federation Proceedings**, v. 35, n. 1, p. 23-35, 1976.
- ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs - From Localized to Highly Dispersed Genome Components. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 742, 2023.
- SILVA, M. J. *et al.* Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, p. 141-147, 2020.
- SILVA, B. S. M. L. *et al.* 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, n. 12, e0223466, 2019.
- SILVA, A. A. *et al.* Karyotypic description of the stingless bee *Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) with emphasis on the presence of B chromosomes. **Comparative Cytogenetics**, v. 12, n. 4, p. 471–482, 2018.
- SUEOKA, N. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: A compilation of old and new data. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 31–40, 1961.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: PENA, S. D. J. *et al.* (orgs.). DNA Fingerprinting: State of the Science. p. 21-28, 1993.
- TAVARES, M. G.; LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 241–258, 2017.
- TAVARES, M. G. *et al.* Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 43, p. 731-736, 2012.
- TEIXEIRA, G. A. *et al.* Evolutionary insights into the genomic organization of major ribosomal DNA in ant chromosomes. **Insect Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 340–354, 2021.
- TOSTA, V. C. *et al.* Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 144, n. 3, p. 220-226, 2014.
- TOSTA, V. C. *et al.* A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, n. 2-4, p. 279-283, 2004.

TRAVENZOLI, N. M. *et al.* The evolution of haploid chromosome numbers in Meliponini. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0224463, 2019.

VĚCHTOVÁ, P. *et al.* AT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. **Genetica**, v. 144, p. 385–395, 2016.

VELTHUIS, H. H.; VAN DOORN, A. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**, v. 37, n. 4, p. 421-451, 2006.

VIGNATI, Z. B. M. *et al.* Cytogenomics of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae) and the Sharing of a Satellite DNA Family in Several Neotropical Meliponini Genera. **Genes**, v. 16, n. 1, p. 86, 2025.

VITALE, D.; GARCIA, S.; DODSWORTH, S. Reconstructing phylogenetic relationships based on repeat sequence similarities. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 147, p. 106766, 2020.

WAGNER, R. P.; MAGUIRE, M. P.; STALLINGS, R. L. **Chromosomes: a synthesis**. New York: Wiley-Liss, 1993. p. 523.

WARING, M.; BRITTEN, R. J. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. **Science**, v. 154, n. 3750, p. 791-794, 1966.

WILLIAMS, P. H. *et al.* Bumblebees with big teeth: revising the subgenus *Alpigenobombus* with the good, the bad and the ugly of numts (Hymenoptera: Apidae). **European Journal of Taxonomy**, v. 892, p. 1–65, 2023.

WILLIAMS, P. H.; JEPSEN, S. **IUCN BBSG – Bumblebee Specialist Group Report 2013**. London: Natural History Museum, 2014.

WILLIAMS, P. H. *et al.* A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 46–74, 2008.



WILLIAMS, P. H. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of The Natural History Museum (Entomology)**, v. 67, p. 79–152, 1998.

2 CAPÍTULO 01: CYTOGENOMICS OF *Frieseomelitta varia* (HYMENOPTERA: APIDAE) AND THE SHARING OF A SATELLITE DNA FAMILY IN SEVERAL NEOTROPICAL MELIPONINI GENERA.

Artigo publicado na revista *Genes*

Article

Cytogenomics of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae) and the Sharing of a Satellite DNA Family in Several Neotropical Meliponini Genera

Zulemara B. M. Vignati ¹, Gisele A. Teixeira ¹, Marina S. Cunha ^{1,2} , Jaqueline A. Pereira ¹ and Denilce M. Lopes ^{1,*} 

¹ Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Viçosa 36570-900, Minas Gerais, Brazil; zulemara.bio@gmail.com (Z.B.M.V.); g.amaroteixeira@gmail.com (G.A.T.); marina.souza.cunha@gmail.com (M.S.C.); jaquelineamorim@gmail.com (J.A.P.)

² Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, Seropédica 23891-970, Rio de Janeiro, Brazil

* Correspondence: denilce.lopes@ufv.br

Abstract: Background/Objectives: A striking feature of the karyotypes of stingless bees is the large amount of heterochromatin present in most species. Cytogenomic studies performed in some Meliponini species have suggested that evolutionary events related to the diversification and amplification of satellite DNA families in the heterochromatin may reflect the structuring of phylogenetic clades in this tribe. In this study, we performed a genomic analysis in *Frieseomelitta varia* to characterize different satDNA families in its genome. We also investigated the presence of the most abundant satDNA family of *F. varia* in its own chromosomes, in two other *Frieseomelitta* species, and in other Meliponini genera encompassing the three main clades of Neotropical Meliponini, according to the available molecular phylogeny. Methods: Genomic analyses were performed using RepeatExplorer2 on the Galaxy platform, and chromosomal investigations were conducted using fluorescent in situ hybridization. Results: Seven satDNA families were recovered, which together totaled an abundance of 11.223% of the analyzed *F. varia* genomic fraction. The most abundant satDNA family, FvarSat01-306, predominates in the analyzed repetitive fraction (representing around 89%) and was recently amplified and homogenized in almost all the heterochromatin of *F. varia*. In addition, the data revealed an unprecedented sharing of this satDNA family in the centromeric/pericentromeric heterochromatin among different Meliponini genera, with independent amplifications and loss of this sequence in some taxa. Conclusions: One family of satellite DNA makes up most of the heterochromatin in this species and is shared with other Meliponini.

Keywords: evolution; genome; heterochromatin; repetitive DNA; stingless bees



check for updates

Received: 29 November 2024

Revised: 8 January 2025

Accepted: 10 January 2025

Published: 15 January 2025

Citation: Vignati, Z.B.M.; Teixeira, G.A.; Cunha, M.S.; Pereira, J.A.; Lopes, D.M. Cytogenomics of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae) and the Sharing of a Satellite DNA Family in Several Neotropical Meliponini Genera. *Genes* **2025**, *16*, 86. <https://doi.org/10.3390/genes16010086>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The constitutive heterochromatin (c-heterochromatin) domain is a chromosomal region that remains highly condensed throughout the cell cycle and is typically enriched with repetitive sequences such as satellite DNA (here called satDNA) and transposable elements [1,2]. This type of chromatin plays an important role in the assembly of CenH3 (centromere-specific histone H3 protein) into nucleosomes and kinetochores, influencing correct chromosome segregation and maintaining genomic stability by restricting the activ-

ity of mobile elements and preventing the non-homologous recombination of repetitive sequences during DNA repair [2–4].

As a result of the classic cytogenetic studies conducted on stingless bees (Meliponini tribe), the importance of heterochromatin in the chromosomal evolution of these insects has already been discussed. Most species were found to have a significant amount of heterochromatin located along one of the chromosomal arms or even throughout almost the entire chromosomal length [5]. Consistent with these findings, amplifications of heterochromatin have been suggested as the origin of genomes with higher 1C values (the amount of DNA in the haploid nuclear genome) observed in some species of Meliponini, highlighting the role of heterochromatin in the genomic evolution of these bees [5,6].

Over the last few years, molecular cytogenetic studies using various methodologies for the production of specific probes (such as chromosomal microdissection, restriction enzymes, and C_0t -DNA renaturation kinetics) and fluorescent in situ hybridization (FISH) in different stingless bees genera have provided the first insights into the composition and evolution of heterochromatin in Meliponini [7–10]. These studies revealed that heterochromatin contains a highly abundant repetitive DNA sequence that is shared between chromosomes of the same species and between closely related species of the same genus but not between the different genera. However, a recent study performed by Campos et al. [11] using C_0t -DNA has revealed the sharing of repetitive sequences between the genera *Plebeia* and *Friesella* in part of the heterochromatin.

However, the identity of the sequences constituting heterochromatin remained unknown until recently. With the advent of cytogenomic approaches—which integrate genomic information, chromosomal data, and bioinformatics tools—a deeper understanding of the composition and evolution of heterochromatin in Meliponini has begun to emerge [12,13]. The first study using this approach in stingless bees was conducted in the genus *Melipona*, showing that despite sharing several satDNA families between species, the most abundant satDNA is unique within the subgenera *Michmelia* and *Melipona*, which have very disparate heterochromatin patterns, i.e., high and low heterochromatin content, respectively [12]. In addition, although the satellitome (the set of satDNAs in the genome) of these species shows homology in eleven satDNA families, these sequences have undergone different amplification and retraction processes over time [12]. These findings are consistent with the library hypothesis, which proposes that a group of related species may share satDNA families inherited from a common ancestor, but these families can evolve differently in each species [14].

Similar results were observed with the characterization of the stingless bee *Trigona hyalinata* satellitome [13]. The authors demonstrated that *T. hyalinata* heterochromatin is also composed of a predominant satDNA (ThyaSat01-301) that is highly abundant in this region. By associating phylogenetic and cytogenomic data [13,15], the results showed that this satDNA is shared with other *Trigona* species of the same clade but not observed in species of the sister clade, indicating a divergent evolution of heterochromatin in the two clades of *Trigona*. Thus, cytogenomic studies on *Melipona* and *Trigona* have suggested that evolutionary events related to the diversification and amplification of the satellitome may reflect the structuring of phylogenetic clades in the Meliponini tribe [12,13].

Recently, genome sequencing data from the stingless bee *F. varia* became available, revealing a large proportion of repetitive components [16], presenting an opportunity to use this data in cytogenomic analyses. Cytogenetic studies on *F. varia* show that this species has $2n = 30$ chromosomes, with heterochromatin distributed in the centromeric region of the chromosomes and along one arm in most pairs [5,16,17]. Additionally, 12 other taxa of *Frieseomelitta* have been studied cytogenetically, showing a conserved chromosome number of $2n = 30$, with the exception of *Frieseomelitta longipes*, with $2n = 34$ [5,16–20]. C-banding

data for some of these species show a high heterochromatic content similar to the pattern observed in *F. varia* [5,16–19].

In this study, we performed a genomic analysis in *F. varia* to identify different satDNA families in its genome and to characterize these sequences in terms of their abundance and divergence. We performed chromosomal mapping of the most abundant satDNA family of *F. varia* across three *Frieseomelitta* taxa to determine if this sequence is the main constituent of heterochromatin in these taxa and whether it is shared within the genus. Additionally, we investigated the presence of this predominant satDNA in other Meliponini genera, both phylogenetically close to and distant from *Frieseomelitta*, according to the molecular phylogeny proposed by Rasmussen and Cameron [21]. The results obtained from these experiments provided new insights into the evolution of satDNA in the Meliponini tribe.

2. Materials and Methods

2.1. Analysis of satDNA in the Genome of the Stingless Bee *F. varia*

The raw genome data of *F. varia* were obtained from the publicly accessible database Sequence Read Archive (SRA)-NCBI, with the accession number SRX6799462. The authors used NGS on the Illumina HiSeq2500 platform to generate a library of short paired-end reads (2×101 bp) [16]. The quality of the genomic data was inspected using the FastQC Read Quality Reports tool, implemented on the public platform Galaxy (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>, accessed on 1 February 2022). The satDNAs from the genome of *F. varia* were identified using RepeatExplorer2 (Galaxy Version 2.3.8.1), available on the Galaxy platform (accessed on 3 February 2022). These analyses followed the protocol of Novák et al. [22]. The pre-processing of the paired-end reads was performed, which included trimming, quality filtering, Cutadapt filtering, and interlacing of genomic reads. RepeatExplorer2 clustering was performed with default parameters using a random sample of one million reads. After this, the identification of satDNAs was performed using the TAREAN tool [23]. We compared the identified satDNA sequences to check a possible common identity between them using the Geneious software V4.8 [24]. Considering their level of sequence identity, satDNA sequences were classified according to the methods of Ruiz-Ruano et al. [25] into families (>80%) and superfamilies (>60%). In addition, the nomenclature of the identified satDNAs was performed according to the methods of Ruiz-Ruano et al. [25]. These sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: PQ390412, PQ390413, PQ390414, PQ390415, PQ390416, PQ390417, and PQ390418.

The abundance and divergence of each satDNA family was estimated by means of RepeatMasker [26] using the Cross_match. A total of ten million randomly selected reads were used for this analysis. The abundance of each satDNA family was estimated based on its proportion in the genome, and the sum of the mapped nucleotides belonging to one specific satDNA was divided by the total number of nucleotides in the library. The divergence of the satDNAs was determined using the Kimura two-parameter (K2P) model using the alcDivergenceFromAlign.pl script in RepeatMasker software v4.1.4 [26]. The repeat landscapes were generated by comparing the sequence divergence versus the abundance of each satDNA family.

2.2. Obtaining Metaphase Chromosomes and Heterochromatin Distribution Patterns in Meliponini Species

Mitotic chromosomes from different stingless bee species (Table 1) were obtained from the cerebral ganglia of larvae after meconium elimination, following the protocol described by Imai et al. [27]. In total, 17 species were analyzed, covering the three clades of Neotropical Meliponini: *Trigonisca* clade (Clade 1), *Melipona* clade (Clade 2), and the

remaining clade that includes the other Neotropical genera (Clade 3), according to the molecular phylogeny proposed by Rasmussen and Cameron [21].

Table 1. Stingless bee species (Meliponini) analyzed in the cytogenetic experiments. Species are distributed in the three main clades (Clade 1: *Trigonisca*, Clade 2: *Melipona*, and Clade 3: most Neotropical Meliponini genera), according to the phylogeny proposed by Rasmussen and Cameron [21], and their respective geographic locations: Brazilian states, MG—Minas Gerais, AM—Amazonas, PA—Pará, and DF—Distrito Federal.

| Species | Phylogenetic Clades | Locality |
|---|---------------------|--|
| <i>Frieseomelitta varia</i> Lepeletier, 1836 | Clade 3 | Uberlândia, MG, Brazil |
| <i>Frieseomelitta trichocerata</i> Moure, 1990 | Clade 3 | Redenção, PA, Brazil; Presidente Figueiredo, AM, Brazil |
| <i>Frieseomelitta</i> sp. | Clade 3 | Brasília, DF, Brazil |
| <i>Duckeola ghiliani</i> Spinola, 1853 | Clade 3 | Presidente Figueiredo, AM, Brazil |
| <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille, 1811 | Clade 3 | Mutum, MG, Brazil |
| <i>Friesella schrottkyi</i> Friese, 1900 | Clade 3 | Rio Paranaíba, MG, Brazil |
| <i>Schwarziana quadripunctata</i> Latreille, 1836 | Clade 3 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Scaura latitarsis</i> Friese, 1900 | Clade 3 | Presidente Figueiredo, AM, Brazil |
| <i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure, 1950 | Clade 3 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Geotrigona subterranea</i> Friese, 1901 | Clade 3 | Passos, MG, Brazil |
| <i>Tetragona elongata</i> Lepeletier & Serville, 1828 | Clade 3 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Trigona spinipes</i> Fabricius, 1793 | Clade 3 | Januária, MG, Brazil |
| <i>Cephalotrigona capitata</i> Smith, 1854 | Clade 3 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Partamona helleri</i> Friese, 1900 | Clade 3 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836 | Clade 2 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Melipona mondury</i> Smith, 1863 | Clade 2 | Viçosa, MG, Brazil |
| <i>Leurotrigona muelleri</i> Friese, 1900 | Clade 1 | Passos, MG, Brazil |

To determine heterochromatin distribution patterns, the C-banding technique was performed according to the methods of Sumner [28], with adaptations regarding incubation times in specific solutions: 1 min in HCl, 6 min in Ba(OH)₂, and 5 min in 2 × SSC for *Frieseomelitta* species; 1 min in HCl, 4 min in Ba(OH)₂, and 4 min in 2 × SSC for *Duckeola ghiliani*; and 1 min in HCl, 6 min Ba(OH)₂, and 6 min in 2 × SSC for *Partamona helleri*. In addition, sometimes, conventional staining with 4% Giemsa, without any pretreatment with hydrochloric acid, barium hydroxide, and saline, is sufficient to observe heterochromatin distribution patterns in chromosomes [27,29], which was the case for the other stingless bee species (Table 1).

2.3. Chromosomal Mapping of the Most Abundant satDNA Family from the *F. varia* Genome Using Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

In order to investigate the presence of the most abundant satDNA family (FvarSat01-306) of the *F. varia* genome in the karyotypes of other species of *Frieseomelitta* and other Meliponini genera (Table 1), we produced a probe of this satDNA via polymerase chain reaction (PCR) using the following manually designed specific primers: F- 5'ATTTCGTGTTTCTCGATGCCA 3' and R- 5'ATTTCGGCTAGATTCGAAGATA 3'. The genomic DNA of *F. varia* was extracted using the DNeasy Kit (Qiagen Inc., Redwood City, CA, USA), following the manufacturer's instructions. The PCR solutions totaling 10 µL

contained 5.52 μL of H_2O , 1 μL of template DNA (100 ng/ μL), 0.4 μL of each primer (10 mmol/L) (forward and reverse), 2 μL of $5 \times$ Color-less GoTaq Flexi buffer, 0.08 μL of dNTPs (20 mmol/L), 0.4 μL of MgCl_2 (25 mmol/L), and 0.2 μL of GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/ μL) (Promega, Maddison, WI, USA). The PCR conditions included an initial denaturation step at 94 $^\circ\text{C}$ for 5 min and 30 cycles at 94 $^\circ\text{C}$ (30 s), 60 $^\circ\text{C}$ (30 s), and 72 $^\circ\text{C}$ (80 s), plus a final extension at 72 $^\circ\text{C}$ for 5 min. The PCR products were checked using a 1% agarose gel.

Mapping of the FvarSat01-306 probe was performed using the FISH technique, according to the methods of Pinkel et al. [30]. The FvarSat01 probe was labeled using the indirect method with digoxigenin-11-dUTP using the Dig-Nick-Translation Mix kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The identification of probe signals was performed using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The chromosomes were counterstained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The metaphases were captured on an Olympus BX53F microscope equipped with an Olympus XM10 camera using CellSens imaging software v1.12 and WG (510–550 nm) filters for rhodamine and WU (330–385 nm) filters for DAPI. At least 30 metaphases per species were used to determine the patterns, employing the FISH technique. The karyotypes were organized using Adobe Photoshop[®] CS6 software.

Additionally, we performed a parallel analysis to investigate the presence of the most abundant satDNA family from the *T. hyalinata* genome (ThyaSat01-301) in the chromosomes of closely related genera, including *Cephalotrigona*, *Scaptotrigona*, *Tetragona*, and *Geotrigona*. These species form a branch within Clade 3, according to the molecular phylogeny proposed by Rasmussen and Cameron [21]. The satDNA ThyaSat01-301 probe was produced using specific primers designed by Pereira et al. [13] and template DNA from *T. hyalinata*. The preparation of this probe, as well as the FISH assays, followed the methodologies described previously.

3. Results

3.1. Genomic Analysis of satDNAs in *F. varia*

Bioinformatic analyses identified seven satDNA families, which together totaled an abundance of 11.223% of the *F. varia* genome, considering the genomic fraction analyzed (Table 2). The most abundant satDNA family (FvarSat01-306) represented 9.971% of the genome, while the other satDNAs together corresponded to only 1.252%. Therefore, the FvarSat01-306 satDNA is approximately eight times more abundant in the *F. varia* genome compared to all other satDNA families combined. The lowest abundance was observed in the satDNA family FvarSat07-145, with 0.014% (Table 2).

Table 2. Main characteristics of satellite DNA (satDNA) families identified in the genome of *F. varia*.

| SatDNA Family | SF | ML | A + T% | Divergence % | Abundance % |
|----------------|----|------|--------|--------------|-------------|
| FvarSat01-306 | | 306 | 66 | 4.62 | 9.971% |
| FvarSat02-449 | | 449 | 53.2 | 2.92 | 0.803% |
| FvarSat03-1145 | | 1145 | 58.4 | 7.73 | 0.245% |
| FvarSat04-145 | 1 | 145 | 54.5 | 22.09 | 0.117% |
| FvarSat05-131 | | 131 | 72.5 | 8.67 | 0.054% |
| FvarSat06-145 | 1 | 145 | 59.3 | 18.36 | 0.019% |
| FvarSat07-170 | | 170 | 71.2 | 6.13 | 0.014% |
| Total | | | | | 11.223% |

SF = superfamilies; ML = monomer length; A + T% = content A + T.

The length of the monomers varied from 131 to 1445 bp. The three most abundant satDNA families, namely FvarSat01, FvarSat02, and FvarSat03, possessed the largest

monomers, with 306 bp, 449 bp, and 1145 bp, respectively. The A + T base pair content of the satDNA families ranged from 53.2 to 72.5%, with an average of 62.15% (Table 2). These values show a predominance of A+T base pairs in the different satDNA families identified, which follows the whole genome pattern of *F. varia*, with an estimated A+T base content of 63%, see [16]. Comparative analysis between the satDNA sequences showed a homology greater than 50% between two families (FvarSat04-145 and FvarSat06-145), allowing them to be grouped into the same superfamily (SF1).

The divergence between satDNA families ranged from 2.9% to 22.09%, with an average of 10.07% (Table 2). According to the landscape graph (abundance versus divergence), five satDNA families, including the most abundant in the *F. varia* genome, showed an abundance peak at low divergence (around 5%), indicating recent amplifications of these families with high sequence homogenization (Figures 1A and S1). However, the satDNA families FvarSat04-145 and FvarSat06-145, which are included in the same superfamily, showed an abundance peak at higher divergence values, indicating the accumulation of mutations in these sequences (Figures 1B,C and S1).

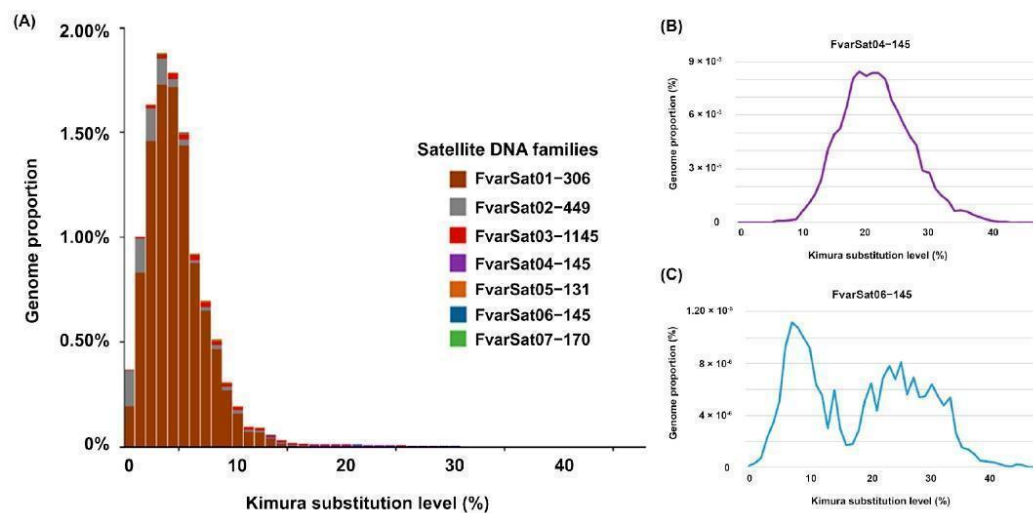


Figure 1. Landscape (abundance versus divergence) for the satDNA families identified in the *F. varia* genome (A). Note in (A) the predominance of the FvarSat01-306 family in relation to the other satDNAs. This family showed an abundance peak at low divergence values (about 5%), revealing its recent amplification and high sequence homogenization. Landscapes in (B,C) for the FvarSat04-145 and FvarSat06-145 families, respectively, show an abundance peak at high divergence values, indicating the accumulation of mutations in these sequences.

3.2. Chromosomal Analysis: C-Banding and Physical Mapping of the Most Abundant satDNA Family (FvarSat01-306) in Different Meliponini Species

In general, the distribution of heterochromatin observed in the studied species was predominantly located at the centromeres and along one chromosome arm (either short or long) in most or all chromosomes (Figures 2 and 3). However, a few chromosome pairs exhibited heterochromatin only in the centromeric region, as seen in *F. varia* (pairs 5th m, 7th m, 6th sm, and 1st st) (Figure 2A), *Frieseomelitta trichocera* (pairs 4th m, 6th m, and 9th m) (Figure 2C,E), *Frieseomelitta* sp. (pairs 4th m, 6th m, 8th m, and 1st st) (Figure 2G), and *D. ghilianii* (pairs 2nd m, 6th m, and 6th sm) (Figure 2I). Additionally, some specific patterns in heterochromatin distribution were observed in *Schwarziana quadripunctata*, *Scaura*

latitarsis, and *P. helleri*. The former species displayed eight larger chromosome pairs (1 to 8) with very long heterochromatic arms and nine smaller pairs with short heterochromatic arms (Figure 3C). The second species showed two larger pairs (1 and 8) with very long heterochromatic arms, while the rest of the chromosomes were smaller with short heterochromatic arms (Figure 3E). The last species exhibited two heterochromatic regions with varying intensities: the centromere showed darker staining, while the short arms of some chromosomes displayed lighter staining. Additionally, most of the B chromosome observed in this species was heterochromatic, except for one end, which was euchromatic (Figure 3I).

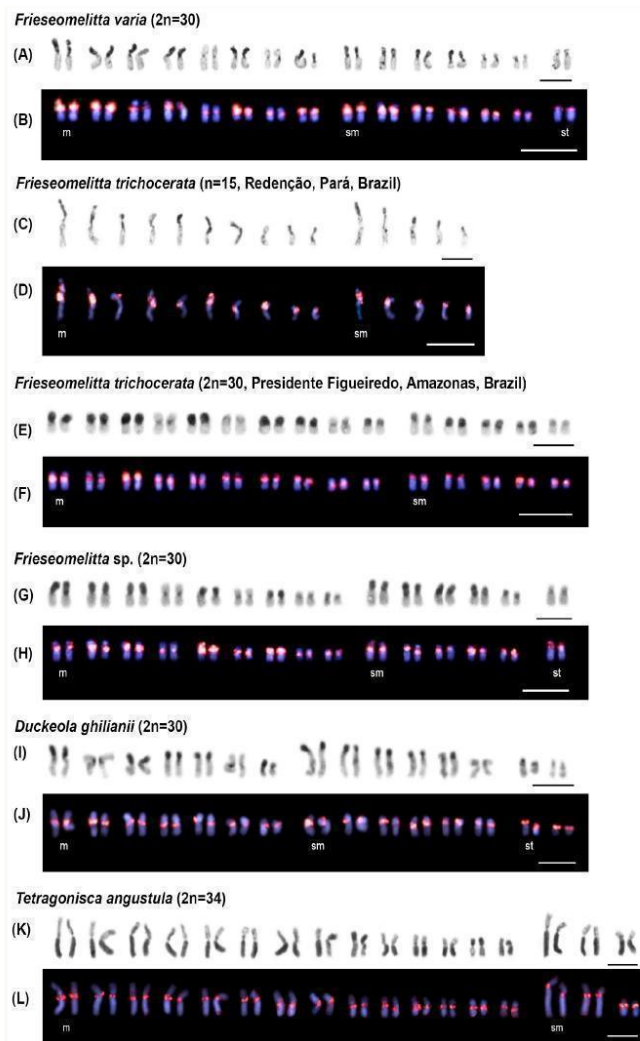


Figure 2. Karyotypes of five stingless bee species showing heterochromatin distribution patterns (darker regions) in (A,C,E,G,I,K). Karyotypes subjected to fluorescent in situ hybridization with the most abundant satDNA family probe FvarSat01-306 (red regions) and counterstaining with DAPI (blue regions) in (B,D,F,H,J,L). Chromosomal classification: m = metacentric, sm = submetacentric, and st = subtelocentric. Bars = 5 μ m.

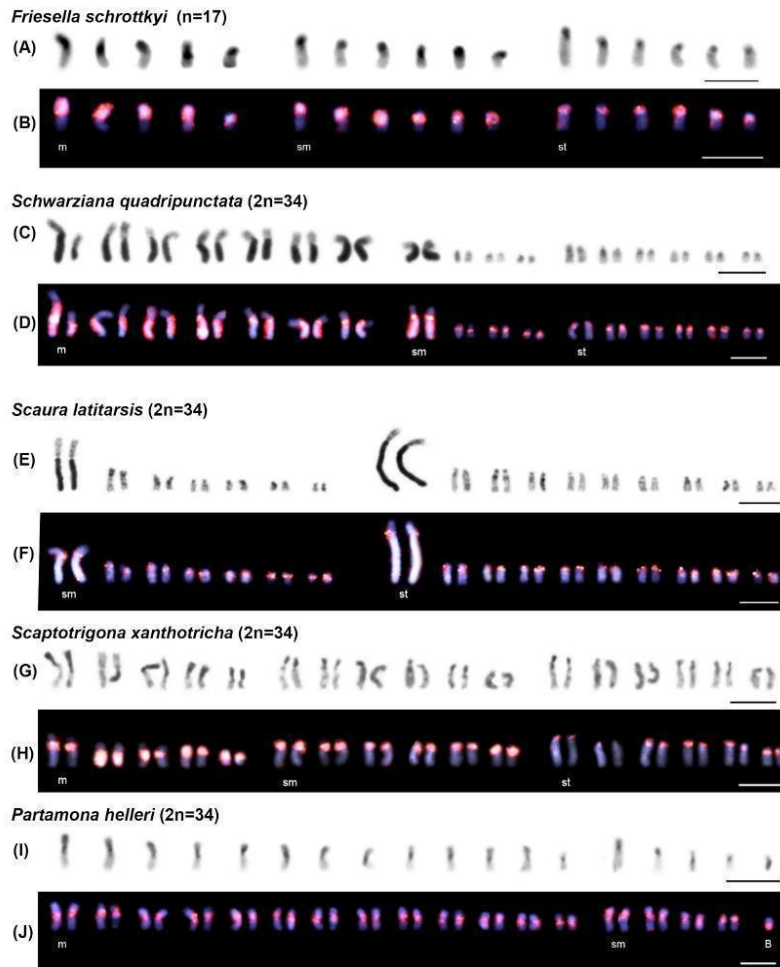


Figure 3. Karyotypes of five stingless bee species showing heterochromatin distribution patterns (darker regions) in (A,C,E,G,I). Karyotypes subjected to fluorescent in situ hybridization with the most abundant satDNA family probe FvarSat01-306 (red regions) and counterstaining with DAPI (blue regions) in (B,D,F,H,J). Chromosomal classification: m = metacentric, sm = submetacentric, and st = subtelocentric. The letter “B” in *P. helleri* karyotypes indicates the B chromosome. Bars = 5 μ m.

FISH assays with the FvarSat01-306 probe revealed different hybridization patterns among the analyzed stingless bee species (Figures 2 and 3). This satDNA family was present in almost all the heterochromatin of *F. varia* (Figure 2B) and in the centromeric/pericentromeric heterochromatin of all chromosomes, as well as in the short arm of only one pair in *F. trichocerata* (Figure 2D,F) and *Frieseomelitta* sp. (Figure 2H). The probe showed positive signals exclusively in the centromeric heterochromatin of *D. ghilianii* (Figure 2J), *Tetragonisca angustula* (Figure 2L), and *S. latitarsis* (Figure 3F), while marking all the heterochromatin in *Friesella schrottkyi* (Figure 3B) and *Scaptotrigona xanthotricha* (Figure 3H). In *S. quadripunctata*, FvarSat01-306 was present at the centromeres of all chromosomes and along the long heterochromatic arms of the eight largest pairs

(Figure 3D). Lastly, *P. helleri* showed positive signals in the centromeric/pericentromeric heterochromatin of all chromosomes and in most of the heterochromatin of the B chromosome (Figure 3J).

No hybridization signal with the FvarSat01-306 probe was observed in the chromosomes of *Geotrigona subterranea*, *Tetragona elongata*, *Trigona spinipes*, or *Cephalotrigona capitata*, which also belong to Clade 3, nor in *Leurotrigona muelleri*, *Melipona quadrifasciata*, or *Melipona mondury* (Figure S2), which are included in the other two Neotropical clades. In addition, no hybridization signal with the satDNA family ThyaSat01-301 probe from the *Trigona hyalinata* genome was observed in the chromosomes of *G. subterranea*, *T. elongata*, *C. capitata*, and *S. xanthotricha* (Figure S3).

Figure 4 summarizes the data on the chromosomal location of the most abundant satDNA family FvarSat01-306 in the heterochromatin of the analyzed stingless bees associated with the phylogenetic relationships of these species, according to Rasmussen and Cameron [21].

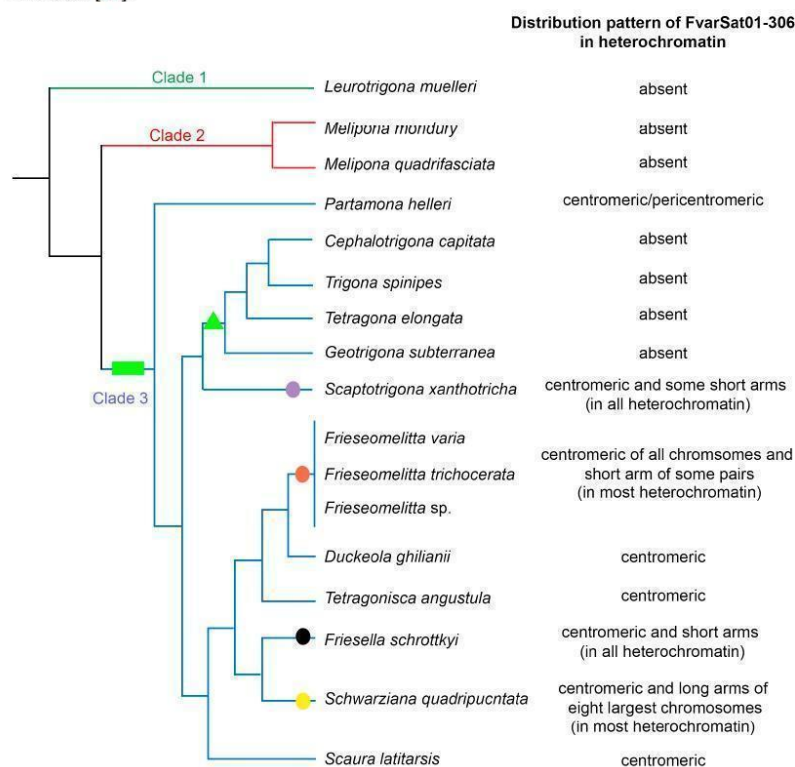


Figure 4. Data on the chromosomal location of the most abundant satDNA family FvarSat01-306 in the heterochromatin of the analyzed stingless bees associated with the phylogenetic relationships of these species, according to Rasmussen and Cameron (2010). Symbols represent hypotheses about evolutionary events related to the satDNA FvarSat01-306 across Clade 3 species: the green rectangle indicates the presence of this family in the ancestor of Clade 3; the green triangle signifies the loss of this family in the ancestor of the branch that includes genera *Geotrigona*, *Tetragona*, *Trigona*, and *Cephalotrigona*; the purple, orange, black, and yellow circles represents independent amplifications of this family in the heterochromatin of distinct genera.

4. Discussion

Bioinformatic analysis recovered seven satDNA families in the *F. varia* genome that varied in abundance. The satDNA family FvarSat01-306 constituted 88.8% of this class of repetitive DNA in the analyzed genomic fraction of *F. varia*. FISH analysis showed that satDNA family FvarSat01-306 comprises almost the entire heterochromatin of *F. varia* located in centromeric/pericentromeric regions of all the chromosomes and the short arms of some pairs. In addition, this satDNA family showed a high abundance in low divergence values, indicating that it underwent a recent amplification process and sequence homogenization [25,31] in the heterochromatin of *F. varia*. Similar results were observed in the stingless bees of the *Melipona* and *Trigona* genera, which have a significant amount of heterochromatin. Their satellitomes were predominantly composed of a specific satDNA family that was recently amplified and homogenized in the heterochromatin, becoming the main constituent of this chromosome region [12,13]. This pattern may represent a trend in Meliponini, and the increase in studied species through cytogenomics may confirm this hypothesis.

Our FISH experiments also showed that this satDNA family is shared with other species of the same genus, i.e., *F. trichocerata* and *Friesoemelitta* sp., indicating an amplification event in *Friesoemelitta*. However, in these two species, the distribution of this satDNA was somewhat more restricted, indicating variations between these species that may reflect phylogenetic structures within the genus. As observed in *Melipona* species, other satDNA families and/or transposable elements may constitute the remainder of the heterochromatin [12]. A robust phylogeny for *Friesoemelitta*, along with the cytogenomic analysis of other species, may clarify these questions.

The above-mentioned species belong to Clade 3 in the molecular phylogenetic analyses of the Meliponini tribe [21]. Therefore, we also investigated the presence of satDNA family FvarSat01-306 in different representatives of the branches that comprise this clade, revealing an unprecedented sharing of this satDNA among different genera and an independent amplification and loss of this sequence in some taxa (see Figure 4). The most frequent pattern was the presence of this satDNA family exclusively in the centromeric heterochromatin (i.e., *Partamona*, *Scaura*, *Namotrigona*, *Tetragonisca*, and *Duckeola*), indicating that, in these genera, a different satDNA family constitutes the main portion of the heterochromatin. However, this satDNA family was independently amplified to compose the main heterochromatic sequence in *Schwarziana*, *Friesella*, and *Scaptotrigona*. Interestingly, the other genera that comprise the branch to which *Scaptotrigona* belongs, i.e., *Cephalotrigona*, *Trigona*, *Tetragona*, and *Geotrigona*, lost the satDNA FvarSat01-306.

The satDNA FvarSat01-306 must have appeared in the ancestral representative of Clade 3 around 44 MYA [21], since it is not present in the species of Clades 1 and 2, i.e., *Leurotrigona* and *Melipona*, respectively (Figure 4). After the diversification of Clade 3, this satDNA evolved independently by differential contractions and amplification processes, as predicted by the library hypothesis [14]. Although satDNA can be shared between species, its abundance changes stochastically through expansion and reduction, resulting in interspecifically distinct profiles, which are even observed between lineages/populations within a species [31–39]. Recently, Camacho et al. [31] discussed a model for the evolution of satDNAs, suggesting that satellites undergo repeated amplification–degeneration cycles that can maintain them in the genome for a long period of time through unequal crossing-over or can lead to their disappearance by sequence degeneration through point mutations.

Alternatively, Fry and Salser [40] proposed that the acquisition of a biological function is a determining factor for a satDNA to be maintained over time in the library during long evolutionary periods. The presence of satDNA family FvarSat01-306 in the centromeric heterochromatin of species for at least 44 MYA leads us to speculate regarding whether

or not this sequence possesses a possible function that would cause it to be maintained by natural selection for such a long period of time. SatDNAs are known to be involved in functional interactions necessary for centromere stability and evolution (reviewed in [41]).

In *Trigona*, which is subdivided into two clades that diversified around 19 MYA [15], cytogenomic analysis showed that the satDNA ThyaSat01-301 is shared by species of the same clade, but no signals were found in species belonging to the sister clade [13]. Since *Trigona*, *Cephalotrigona*, *Tetragona*, and *Geotrigona* did not show any signals of FvarSat01-306 in their chromosomes, we tested to determine whether satDNA ThyaSat01-301 (from *Trigona hyalinata*) could be the sequence amplified in this branch of species. This satellite probe hybridized only in *Trigona* chromosomes, showing no signals in *Cephalotrigona*, *Tetragona*, *Geotrigona*, nor in *Scaptotrigona*, indicating diversification in the composition of heterochromatin in different Meliponini branches. Future studies should identify the main constituent of heterochromatin in these species.

The present study showed the evolution of one satDNA family with an ancient origin in Clade 3 of Neotropical Meliponini, with stochastic amplification and loss in different taxa. The available body of data point to the important role of satDNA in the evolution of heterochromatin in this group of bees and its possible role in species diversification. These results reinforce the relevance of further efforts to elucidate and understand the mechanisms that lead to the evolution of these sequences, as well as their biological role.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes16010086/s1>, Figure S1. Landscapes (abundance versus divergence) for each satellite DNA family identified on the genome of *Friesomelitta varia*; Figure S2. Fluorescent in situ hybridization with the most abundant satDNA family probe FvarSa01-306 in different stingless bee species: (A) *Geotrigona subterranea*, (B) *Tetragona elongata*, (C) *Cephalotrigona capitata*, (D) *Trigona spinipes*, (E) *Leurotrigona muelleri*, (F) *Melipona quadrifasciata*, and (G) *Melipona mondury*; Figure S3. Fluorescent in situ hybridization with the most abundant satDNA family probe (ThyaSat01-301) from *Trigona hyalinata* genome in different stingless bee species: (A) *Geotrigona subterranea*, (B) *Tetragona elongata*, (C) *Cephalotrigona capitata*, and (D) *Scaptotrigona xanthotricha*. The probe did not hybridize to any region of the chromosomes in these species. Chromosomes were counterstained with DAPI. Bars = 5 μ m. The probe did not hybridize to any region of the chromosomes in these species. Chromosomes were counterstained with DAPI. Bars = 5 μ m.

Author Contributions: Conceptualization, Z.B.M.V. and D.M.L.; methodology, Z.B.M.V., G.A.T. and J.A.P.; formal analysis, Z.B.M.V., G.A.T. and M.S.C.; investigation, Z.B.M.V., G.A.T. and M.S.C.; writing—original draft preparation, Z.B.M.V., G.A.T. and M.S.C.; writing—review and editing, all authors; visualization, all authors; supervision, D.M.L.; project administration, D.M.L.; funding acquisition, D.M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG—APQ-01369-22). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) provided funding to G.A.T. (postdoctoral scholarship, process number 151445/2024-9).

Institutional Review Board Statement: No ethics approval was required for this study.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article and Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Insect Cytogenomics Group at UNESP—Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, for providing technical support.

Conflicts of Interest: The authors have no competing interests to declare.

References

- Grewal, S.I.; Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 35–46. [CrossRef] [PubMed]
- Allshire, R.C.; Madhani, H.D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 229–244. [CrossRef]
- Saksouk, N.; Simboeck, E.; Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenet. Chromatin* **2015**, *8*, 3. [CrossRef]
- Penagos-Puig, A.; Furlan-Magaril, M. Heterochromatin as an Important Driver of Genome Organization. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *18*, 579137. [CrossRef]
- Cunha, M.S.; Soares, F.A.F.; Clarindo, W.R.; Campos, L.A.O.; Lopes, D.M. Robertsonian rearrangements in Neotropical Meliponini karyotype evolution (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Insect Mol. Biol.* **2021**, *30*, 379–389. [CrossRef]
- Tavares, M.G.; Carvalho, C.R.; Soares, F.A.F.; Campos, L.A.O. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Apidologie* **2012**, *43*, 731–736. [CrossRef]
- Lopes, D.M.; Fernandes, A.; Diniz, D.; Scudeler, P.E.S.; Foresti, F.; Campos, L.A.O. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia* **2014**, *67*, 222–226. [CrossRef]
- Piccoli, M.C.A.; Bardella, V.B.; Cabral-de-Mello, D.C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): Chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie* **2018**, *49*, 497–504. [CrossRef]
- Cunha, M.S.; Campos, L.A.O.; Lopes, D.M. Insights into the heterochromatin evolution in the genus *Melipona* (Apidae: Meliponini). *Insectes Soc.* **2020**, *67*, 391–398. [CrossRef]
- Pereira, J.A.; Salomão, T.M.F.; Lopes, D.M. Different repetitive DNA sequences make up heterochromatin in Meliponini. *Apidologie* **2020**, *51*, 855–860. [CrossRef]
- Campos, C.L.; Teixeira, G.A.; Lopes, D.M.; Waldschmidt, A.M. Molecular cytogenetics reveals insights into heterochromatin composition and karyotype evolution in species of the *Plebeia* group (Apidae: Meliponini). *Insectes Soc.* **2024**. submitted.
- Pereira, J.A.; Milani, D.; Ferretti, A.B.S.M.; Bardella, V.B.; Cabral-de-Mello, D.C.; Lopes, D.M. The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. *Chromosoma* **2021**, *130*, 251–262. [CrossRef]
- Pereira, J.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Lopes, D.M. The Satellite DNAs Populating the Genome of *Trigona hyalinata* and the Sharing of a Highly Abundant satDNA in *Trigona* Genus. *Genes* **2023**, *14*, 418. [CrossRef]
- Salser, W.; Bowen, S.; Browne, D.; El-Adli, F.; Fedoroff, N.; Fry, K.; Heindell, H.; Paddock, G.; Poon, R.; Wallace, B.; et al. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. *Fed. Proc.* **1976**, *35*, 23–35. [PubMed]
- Rasmussen, C.; Camargo, J.M.F. A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* s.s. (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie* **2008**, *39*, 102–118. [CrossRef]
- De Paula-Freitas, F.C.; Lourenço, A.P.; Nunes, F.M.; Paschoal, A.R.; Abreu, F.C.; Barbin, F.O.; Bataglia, L.; Cardoso-Júnior, C.A.M.; Cervoni, M.S.; Silva, S.R.; et al. The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia*—A highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 386. [CrossRef]
- Rocha, M.; Pompolo, S.; Campos, L.A.O. Citogenética da Tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In *Apoidae Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*; UNESCO: Criciúma, Brazil, 2003; pp. 311–320.
- Santos, J.M.; Diniz, D.; Rodrigues, T.A.S.; Cioffi, M.D.B.; Waldschmidt, A.M. Heterochromatin Distribution and Chromosomal Mapping of Microsatellite Repeats in the Genome of *Frieseomelitta* Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Fla. Entomol.* **2018**, *101*, 33–39. [CrossRef]
- Carvalho, A.F.; Costa, M.A. Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genet. Mol. Biol.* **2011**, *34*, 237–239. [CrossRef] [PubMed]
- Do Nascimento, R.M.; Carvalho, A.F.; Santana, W.C.; Barth, A.; Costa, M.A. Karyotype diversity of stingless bees of the genus *Frieseomelitta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Caryologia* **2020**, *73*, 121–126.
- Rasmussen, C.; Cameron, S.A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* **2010**, *99*, 206–232. [CrossRef]
- Novák, P.; Neumann, P.; Macas, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 3745–3776. [CrossRef] [PubMed]
- Novák, P.; Ávila Robledillo, L.; Koblížková, A.; Vrbová, I.; Neumann, P.; Macas, J. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, e111. [CrossRef]
- Drummond, A.; Ashton, B.; Cheung, M.; Helid, J.; Kearse, M.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Thierer, T.; Wilson, S. Geneious v4.8. 2009. Available online: <http://www.geneious.com> (accessed on 22 February 2022).
- Ruiz-Ruano, F.J.; López-León, M.D.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28333. [CrossRef]

26. Smit, A.; Hubley, R.; Green, P. RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015. 2017. Available online: <http://www.repeatmasker.org/> (accessed on 22 February 2022).
27. Imai, H.T.; Taylor, R.W.; Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **1988**, *63*, 159–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **1972**, *83*, 304–306. [[CrossRef](#)]
29. Imai, H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Jpn. J. Genet.* **1991**, *66*, 635–661. [[CrossRef](#)]
30. Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2934–2938. [[CrossRef](#)]
31. Camacho, J.P.M.; Cabrero, J.; López-León, M.D.; Martín-Peciña, M.; Perfectti, F.; Garrido-Ramos, M.A.; Ruiz-Ruano, F.J. Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. *BMC Biol.* **2022**, *20*, 36.
32. Mestrović, N.; Plohl, M.; Mravinac, B.; Ugarković, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*—Experimental evidence for the “library” hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* **1998**, *15*, 1062–1068. [[CrossRef](#)]
33. Bolsheva, N.L.; Melnikova, N.V.; Kirov, I.V.; Dmitriev, A.A.; Krasnov, G.S.; Amosova, A.V.; Samatadze, T.E.; Yurkevich, O.Y.; Zoshchuk, A.S.; Kudryavtseva, A.V.; et al. Characterization of repeated DNA sequences in genomes of blue-flowered flax. *BMC Evol. Biol.* **2019**, *19*, 79–88. [[CrossRef](#)]
34. Palacios-Gimenez, O.M.; Milani, D.; Song, H.; Marti, D.A.; López-León, M.D.; Ruiz-Ruano, F.J.; Camacho, J.P.M.; Cabral-de-Mello, D.C. Eight million years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the ins and outs of the library hypothesis. *Genome Biol. Evol.* **2020**, *12*, 88–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lima, L.G.; Ruiz-Ruano, F.J. In-depth satellitome analyses of 37 *Drosophila* species illuminate repetitive DNA evolution in the *Drosophila* genus. *Genome Biol. Evol.* **2022**, *14*, evac064.
36. Anjos, A.; Milani, D.; Bardella, V.B.; Paladini, A.; Cabral-de-Mello, D.C. Evolution of satDNAs on holocentric chromosomes: Insights from hemipteran insects of the genus *Mahanarva*. *Chromosome Res.* **2023**, *31*, 5. [[CrossRef](#)]
37. Mora, P.; Rico-Porras, J.M.; Palomeque, T.; Montiel, E.E.; Pita, S.; Cabral-de-Mello, D.C.; Lorite, P. Satellitome Analysis of *Adalia bipunctata* (Coleoptera): Revealing Centromeric Turnover and Potential Chromosome Rearrangements in a Comparative Interspecific Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Félix, A.P.; de Amorim, I.C.; Milani, D.; Cabral-de-Mello, D.C.; Moura, R.C. Differential amplification and contraction of satellite DNAs in the distinct lineages of the beetle *Euchochroma gigantea*. *Gene* **2024**, *927*, 148723. [[CrossRef](#)]
39. Cabral-de-Mello, D.C.; Palacios-Gimenez, O.M. Repetitive DNAs: The “invisible” regulators of insect adaptation and speciation. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2024**, *67*, 101295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Fry, K.; Salser, W. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* **1977**, *12*, 1069–1084. [[CrossRef](#)]
41. Plohl, M.; Meštrović, N.; Mravinac, B. Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma* **2014**, *123*, 313–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3 CAPÍTULO 02: ANÁLISE DO CITOGENÔMICA DE ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO *Partamona* SCHWARZ, 1939.

Análise citogenômica de abelhas sem ferrão do gênero *Partamona* Schwarz, 1939

Zulemara Boldrini Manhago Vignati

Resumo: O gênero *Partamona* Schwarz 1939 compreende 33 espécies de abelhas sem ferrão. Neste estudo, realizamos uma análise genômica de quatro espécies desse gênero: *P. ailyae*, *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri*, com o objetivo de identificar as famílias de DNAs satélites (satDNAs) presentes nos genomas dessas espécies e caracterizá-las quanto à abundância e divergência. A partir desses dados, uma sonda específica foi construída para o satDNA mais abundante, a qual foi utilizada para investigar sua distribuição cromossômica em populações de *P. helleri* com presença ou não de cromossomos B, e outras espécies de *Partamona*. Os resultados obtidos evidenciaram que a abundância de satDNA nos genomas analisados variou de 2,612% em *P. ailyae* a 11,103% em *P. cupira*. Identificamos oito famílias de satDNA presentes nas quatro espécies, destacando-se a predominância do satDNA PartamonaSat01-316 em todas elas. Esse satDNA apresentou os menores índices de divergência em todas as espécies. A análise da distribuição cromossômica do satDNA PartamonaSat01-316 em *P. rustica*, *P. chapadicola* e *P. helleri*, revelou sua localização preferencial nas regiões de centrômeros e heterocromatina pericentromérica, além de estar presente em todos os cromossomos B de *P. helleri*. Esses achados indicam a presença de um satDNA abundante no gênero *Partamona*, associado às regiões de heterocromatina e centrômeros, corroborando a hipótese de que o satDNA desempenha um papel relevante na evolução da heterocromatina e pode exercer funções centroméricas em abelhas da tribo Meliponini.

Palavras-chave: DNA repetitivo, Genoma; Heterocromatina; Meliponini.

1 INTRODUÇÃO

O gênero de abelhas sem ferrão *Partamona* (Schwarz, 1939) compreende 32 espécies que ocorrem exclusivamente na região Neotropical, do sul do México ao sul do Brasil (Pedro; Camargo, 2003). Esse grupo apresenta homogeneidade morfológica, com pouca variação de suas características, o que dificulta uma categorização. Assim, a combinação de características como cor do integumento, pilosidade e asas estão entre as utilizadas no reconhecimento das espécies de *Partamona* (Pedro; Camargo, 2003). Além disso, as características comportamentais relacionadas à arquitetura dos ninhos são muito relevantes para uma análise filogenética do grupo (Pedro; Camargo, 2003).

A filogenia baseada em dados morfológicos, proposta por Pedro e Camargo (2003) divide o gênero *Partamona* em quatro grupos: *Bilineata/Epiphytophila*, *Musarum*, *Nigrrior* e *Cupira*, sendo *P. helleri*, *P. cupira* e *P. ailyae* incluídas no grupo *Cupira* e *P. chapadicola* no grupo *Nigrrior*. A filogenia proposta por Rasmussen e Cameron (2010) divide o gênero em dois clados principais. Outra filogenia molecular sugerida por Novaes *et al.* (2021), com base nos dados de dois genes mitocondriais (COI e CytB) de 11 espécies de *Partamona*, também confirmou que esse gênero é dividido em dois clados, estando *P. ailyae* e *P. rustica* no clado A e *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri* no clado B. As relações filogenéticas propostas por Novaes *et al.* (2021) diferem daquelas baseadas em dados morfológicos propostas anteriormente por Pedro e Camargo (2003). Recentemente, Miranda *et al.* (2025), com base em marcadores mitocondriais (Citocromo C oxidase I e 12S genes) e nucleares (1-alfa e rodopsina), propuseram uma nova filogenia, que difere de Pedro e Camargo (2003), bem como de Novaes *et al.* (2021). A principal diferença apresentada por Miranda *et al.* (2025) nessa filogenia refere-se a espécie *P. rustica*, que passa a compor o clado B, juntamente a *P. helleri*, *P. cupira*, *P. chapadicola*, ademais, a espécie *P. ailyae*, parece não ser uma única espécie.

Os genomas dos eucariotos são ricos em elementos repetitivos, como, por exemplo, DNA satélites (satDNA), que consistem em sequências repetidas muitas vezes em tandem (Kim *et al.*, 2014). O satDNA sofre ciclos repetidos de amplificação e degeneração, que podem mantê-lo no genoma por um longo tempo, mas também podem levá-lo ao desaparecimento por degeneração da sequência. A amplificação é responsável pela homogeneização, e a mutação pela degeneração da sequência, com as duas forças agindo recursivamente (Camacho *et al.*, 2022).

A quantidade de satDNA presente no genoma pode variar substancialmente, mesmo entre espécies do mesmo gênero. Em abelhas do gênero *Melipona*, *M. quadrifasciata* possui 2,84% de satDNA no seu genoma enquanto *M. scutellaris* possui 38,41% (Pereira *et al.*, 2021). Apesar de em muitos casos os satDNAs atuarem como um excelente marcador para fornecer informações sobre a história evolutiva dos organismos (Montiel *et al.*, 2022) ainda são pouco representados nas montagens dos genomas devido à natureza repetitiva das suas sequências (Wang *et al.*, 2008)

O advento das novas técnicas de bioinformática facilitou o estudo de sequências repetitivas do genoma, como, por exemplo, o pipeline *RepeatExplorer2*, que identifica sequências repetitivas, incluindo os satDNA do genoma (Novák *et al.*, 2017; Novák; Neumann; Macas, 2020). Essa ferramenta tem permitido o estudo de sequências repetitivas em diversos grupos, tais como insetos (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018; Milani *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019; Bardella; Milani; Cabral-de-Melo, 2020; Pereira *et al.*, 2021; Camacho *et al.*, 2022; Montiel *et al.*, 2022; Mora *et al.*, 2020, 2023; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025), plantas (Fu *et al.*, 2019), mamíferos (Paço *et al.*, 2015) e anfíbios (Silva *et al.*, 2020).

Dados sobre a semelhança de sequências repetitivas têm fornecido resultados importantes para a reconstrução de filogenias (Vitales *et al.*, 2020). Usando uma matriz de similaridade gerada pelo *RepeatExplorer2*, a partir das sequências repetitivas mais abundantes, foi possível realizar a reconstrução filogenética de sete espécies de *Drosophila*, com base nas distâncias genéticas pareadas entre os satelitos das diferentes espécies (Vitales *et al.*, 2020). Os resultados dessa análise, mesmo utilizando dados de poucas repetições, assemelharam-se às inferências filogenéticas baseadas em DNA nuclear, DNA mitocondrial e abundâncias de repetições (Dodsworth *et al.*, 2015).

Em abelhas sem ferrão, os estudos citogenômicos, que integram a ferramenta de bioinformática *RepeatExplorer2*, dados genômicos e cromossômicos, têm contribuído para o entendimento das relações filogenéticas em determinados gêneros. Pereira, Cabral-de-Melo e Lopes (2023) associaram dados filogenéticos (Rasmussen; Camargo, 2008) e citogenômicos obtidos por meio do *RepeatExplorer2*, e verificaram que um dos satélites, o satDNA ThySat01-301, era o mais abundante no genoma da espécie *Trigona hyalinata*, da qual foi obtido o genoma, e que esse satDNA era compartilhado no gênero *Trigona* entre outras espécies do mesmo clado, mas não foram observados sinais de hibridização nas espécies de *Trigona* do

clado irmão. Portanto, os resultados concordam com a filogenia molecular, que mostra a divisão do gênero *Trigona* em dois clados (Rasmussen; Camargo, 2008; Rasmussen; Cameron, 2010).

O gênero *Melipona*, é formado por quatro subgêneros, com espécies que apresentam alto teor de heterocromatina e outras com baixo teor de heterocromatina. Pereira *et al.* (em preparação) mostraram que essas diferenças estão relacionadas com a variação na abundância de alguns satDNAs. Além disso, mesmo compartilhando diversas famílias de satDNA, em cada subgênero existe uma família predominante de satDNA, inclusive nas espécies com menor teor de satDNA no genoma.

O gênero *Partamona* apresenta um número cromossômico conservado de $2n = 34$ para fêmeas e $n = 17$ para machos (Brito; Costa; Pompolo, 1997; Rocha *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2020; Elizeu *et al.*, 2021; Novaes *et al.*, 2021; Tavares *et al.*, 2023). Apesar disso, estudos citogenéticos mostram que essas espécies apresentam diferenças cariotípicas em termos de fórmula cromossômica, quantidade e distribuição da heterocromatina, distribuição de microssatélites e presença de cromossomos supranumerários (Martins *et al.*, 2009; Marthe *et al.*, 2010; Tosta *et al.*, 2014; Tavares; Lopes; Campos, 2017; Lopes *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2021; Novaes *et al.*, 2021; Tavares *et al.*, 2023).

Dentro do gênero *Partamona*, cromossomos B já foram descritos em *P. cupira*, *P. rustica* e *P. helleri* (Costa; Pompolo; Campos, 1992; Brito; Costa; Pompolo, 1997; Tosta *et al.*, 2014; Novaes *et al.*, 2021). Dentre essas espécies, *P. helleri* é a que possui maior número e diversidade de cromossomos B relatados por indivíduo. Martins *et al.* (2014) descreveram dez tipos de cromossomos B em *P. helleri*, sendo até sete por indivíduo. Novaes *et al.* (2021) relataram até cinco cromossomos B por indivíduo. Ambos os estudos mostraram que os cromossomos B apresentavam tamanhos variados, sendo essencialmente heterocromáticos, mas contendo uma porção eucromática. Apesar de geralmente serem menores e apresentarem menor conteúdo de DNA do que os cromossomos do complemento A, alguns podem ter tamanho até superior ao dos cromossomos A (Martins *et al.*, 2014), influenciando o tamanho do genoma nuclear (Novaes *et al.*, 2021).

Considerando a importância que os satDNAs podem ter na composição e evolução do genoma, realizamos uma análise citogenômica para identificar as famílias de satDNA que compõem o satelitoma de quatro espécies de *Partamona*. Baseado nos resultados anteriores em *Meliponini*, também investigamos a presença do satélite mais abundante em diferentes

populações de *P. helleri*, com diferentes números de cromossomos B, bem como em *P. chapadicola* e *P. rustica*, com o intuito de conhecer a distribuição cromossômica do satDNA mais abundante nessas espécies e sua possível participação na composição dos cromossomos B de *P. helleri*. Além disso, buscamos fornecer dados que possam contribuir para esclarecer a origem e composição dos cromossomos B, bem como oferecer informações que ajudem a explicar as relações filogenéticas desse grupo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análises genômicas de espécies de *Partamona*

Análises genômicas foram realizadas em quatro espécies de *Partamona*, com representantes dos dois clados filogenéticos propostos por Novaes *et al.* (2021) e Miranda *et al.* (2025) (Tabela 1). O indivíduo adulto de *P. helleri* foi selecionado de uma colônia na qual não foi observada a presença de cromossomos B. A identificação das espécies foi realizada pela Dra Silvia Pedro. Os espécimes foram depositados na coleção científica da no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Indivíduos adultos das quatro espécies foram armazenados em etanol absoluto para extração do DNA genômico, utilizando o kit DNeasy (Qiagen Inc., CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Tabela 1 - Espécies de *Partamona* utilizadas para análises genômicas neste estudo, seus respectivos clados filogenéticos, de acordo com Miranda *et al.* (2025), grupos morfológicos, de acordo com (Pedro; Camargo, 2003) e suas localidades.

| Espécies | Clado filogenético | Grupo morfológico | Localidade |
|--|--------------------|-------------------|--|
| <i>Partamona ailyae</i> Camargo, 1980 | Clado A | <i>Cupira</i> | Araguari, Minas Gerais, Brasil Bom Despacho, Minas Gerais, Brasil |
| <i>Partamona cupira</i> (Smith, 1863) | Clado B | <i>Cupira</i> | Brasil |
| <i>Partamona chapadicola</i> Pedro & Camargo, 2003 | Clado B | <i>Nigrrior</i> | Redenção, Pará, Brasil |
| <i>Partamona helleri</i> (Friese, 1900) | Clado B | <i>Cupira</i> | Marliéria, Minas Gerais, Brasil |

Os genomas de *Partamona ailyae*, *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri* foram sequenciados na plataforma Illumina NovaSeq 6000 (Inc., San Diego, CA, USA), produzindo uma biblioteca paired-end reads (2×150 bp), utilizando o serviço da Novogene Corporation Inc. (Sacramento, USA). A qualidade dos dados genômicos foi verificada com a ferramenta FastQC *Read Quality Reports*, disponível na plataforma pública Galaxy (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>). As sequências de satDNAs dos genomas das quatro espécies de *Partamona* foram identificadas com o auxílio dos pipelines *Repeat Explorer* (Galaxy Version 2.3.12.1), disponível na plataforma Galaxy (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>, acessado em junho de 2024), utilizando o protocolo de Novák, Neumann e Macas (2020). As leituras brutas no formato FASTQ foram pré-processadas para filtragem de qualidade, remoção

de adaptadores e entrelaçamento de leituras emparelhadas em um arquivo no formato FASTA. Para o agrupamento, foram utilizadas as ferramentas *RepeatExplorer2 Clustering* e *Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN), utilizando-se uma amostra aleatória de 1.000.000 de reads. Em seguida, as famílias foram identificadas com a ferramenta TAREAN (Novák et al., 2017). As sequências identificadas foram analisadas e comparadas com sequências previamente depositadas na base de dados do *Repbase* v20.10 (Bao; Kojima; Kohany, 2015) e do GenBank/NCBI DNA, por meio da ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990), a fim de verificar possíveis semelhanças entre as sequências. Utilizamos o software Geneious v4.8 (Drumond et al., 2009) para verificar se havia homologia entre os satDNAs, que foram classificados em famílias e superfamílias (Ruiz-Ruano et al., 2016). A abundância e divergência de cada família foi estimada por meio do *RepeatMasker* (Smit et al., 2017), utilizando o Cross_match. Um total de 10.000.000 de reads aleatoriamente selecionados foi utilizado para essa análise. A abundância foi estimada com base em sua proporção no genoma, de modo que a soma dos nucleotídeos mapeados pertencentes a um específico foi dividida pelo número total de nucleotídeos na biblioteca. A divergência foi definida utilizando o parâmetro Kimura 2 (K2P), com o script calcDivergenceFromAlign.pl no software *RepeatMasker* (Smit et al., 2017).

A nomenclatura dos satDNAs identificados foi realizada de acordo com Ruiz-Ruano et al. (2016), com modificações. Todos os satélites foram compartilhados entre as quatro espécies analisadas e, portanto, utilizamos o gênero (*Partamona*) para iniciar o nome dos satDNAs. Os satDNAs foram classificados como pertencentes à mesma variante quando apresentaram identidade de sequência superior a 95%, como variantes da mesma família quando tiveram identidade superior a 80% e como superfamílias aquelas com similaridade acima de 60% (Ruiz-Ruano et al., 2016).

2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos e mapeamento do satDNA mais abundante (PartamonaSat01-316) no genoma das espécies de *Partamona* através de hibridização in situ fluorescente (FISH)

Cromossomos mitóticos metafásicos das espécies de *Partamona* (tabela 2) foram obtidos de gânglios cerebrais de larvas pós defecantes de acordo com o protocolo de Imai, Taylor e Crozier (1988) para serem utilizados posteriormente na técnica de FISH. A escolha das espécies foi devido ao posicionamento na filogenia e à disponibilidade de material para

obtenção dos cromossomos. Na espécie *P. helleri*, analisamos indivíduos de sete populações, coletadas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies de *Partamona* utilizadas para análises cromossômicas neste estudo, seus respectivos clados filogenéticos de acordo com Miranda *et al.* (2025) grupos morfológicos, de acordo com (Pedro; Camargo, 2003) e suas localidades.

| Espécies | Clado filogenético | Grupo morfológico | Localidade |
|---|---------------------------|--------------------------|--|
| <i>Partamona rustica</i> Pedro & Camargo, 2003 | Clado B | <i>Cupira</i> | Lontra, Minas Gerais, Brasil |
| <i>Partamona helleri</i> Friese, 1900 | Clado B | <i>Cupira</i> | Jaguaré, Espírito Santo, Brasil Governador Lindenberg, Espírito Santo, Brasil Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil Natividade, Rio de Janeiro, Brasil Porciúncula, Rio de Janeiro, Brasil Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil Macarani, Bahia, Brasil |
| <i>Partamona chapadicola</i> Pedro & Camargo, 2003 | Clado B | <i>Nigrion</i> | Urbano Santos, Maranhão, Brasil |

O satDNA *PartamonaSat01-316* foi encontrado nas quatro espécies de *Partamona* sendo em todas o mais abundante. Por isso, sua sequência consenso foi utilizada para desenhar manualmente os *primers*: F 5' TTCTCGAGCGAGATTCATCA 3' e R 5' CCAATCTCGAACTTCGTTTT 3' para construção da sonda para localização cromossômica. A sonda do satDNA foi amplificada por PCR com as soluções totalizando 10 µL que continham 4.52 µL of H₂O, 2 µL do DNA molde de *P. helleri* (100 ng/µl), 0.4 µL de cada primer (10mmol/L), 2 µL of 5x Color-less GoTaq Flexi buffer, 0.08 µL de dNTPs (20 mmol/L), 0.4 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), e 0.2 µL de GoTaq Flexi DNA Polymerase (5 U/µL) (Promega, Maddison, WI, USA). As condições de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min e 30 ciclos a 94°C (30 s), 60°C (30 s) e 72°C (80 s), mais uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose a 1%.

O mapeamento da sonda do satDNA mais abundante nos cromossomos de cada espécie foi realizado pela técnica de FISH de acordo com Pinkel, Straume e Gray (1986), com alterações descritas por Teixeira *et al.* (2021). A sonda produzida para satDNA foi marcada por método indireto com digoxigenina-11-dUTP utilizando o kit Dig-Nick-Translation Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). A identificação dos sinais da sonda foi realizada através de antidigoxigenina-rodamina (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Os cromossomos foram contracorados com 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Para obtenção das imagens usamos microscópio BX60 equipado com câmera DP23M usando o software de imagem CellSens e os filtros WG (510–550 nm) para rodamina e WU (330–385 nm) para o DAPI. Pelo menos 30 metáfases por espécie foram utilizadas para determinar os padrões com a técnica de FISH.

3 RESULTADOS

A análise genômica das quatro espécies de *Partamona* mostrou que os satDNAs representam uma fração variável do genoma dessas espécies. Em *P. ailyae*, os satDNAs representam 2,612% da fração genômica analisada, enquanto, nas demais espécies, os satDNAs corresponderam a uma porção muito maior do genoma analisado: 11,103% em *P. cupira*, 8,900% em *P. chapadicola* e 7,915% em *P. helleri* (Tabela 3).

Oito famílias de satDNAs foram identificadas nas análises e estavam presentes nos genomas das quatro espécies analisadas (Tabela 3). O conteúdo de pares de bases AT desses satDNAs variou de 41,3% a 82,1%, com média de 58,77% ($\sigma = 12,99$). O comprimento das sequências variou de 140 pb a 627 pb. As análises comparativas entre as sequências de satDNA identificadas mostraram homologia superior a 60% entre duas famílias (PartamonaSat03-145 e PartamonaSat06-145), permitindo agrupá-las na mesma superfamília (SF1). Ambas as famílias exibiram monômeros com 145 pb (Tabela 3).

A abundância das famílias de satDNAs variou consideravelmente entre as espécies. Os maiores valores de abundância foram observados no satDNA PartamonaSat01-316, que foi o mais abundante em todas as quatro espécies analisadas: 2,22% em *P. ailyae*, 9,381% em *P. cupira*, 8,595% em *P. chapadicola*, 7,705% em *P. helleri*. Os menores valores de abundância foram observados no satDNA PartamonaSat08-140, que foi o menos abundante nas quatro espécies analisadas: 0,001% em *P. ailyae*, 0,003% em *P. cupira* e *P. chapadicola* e 0,004% em *P. helleri*.

O satDNA PartamonaSat01-316 se destacou em abundância em relação aos demais em todas as espécies analisadas, sendo aproximadamente seis, cinco, 28 e 36 vezes mais abundante que os outros satDNAs na fração genômica de *P. ailyae*, *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri*, respectivamente. Além disso, o segundo satDNA mais abundante (PartamonaSat02-627) apresentou um valor de abundância muito maior em *P. cupira* (1,604%) em relação às outras três espécies analisadas: 0,188% em *P. ailyae*, 0,173% em *P. chapadicola* e 0,094% em *P. helleri* (Tabela 3). O satDNA PartamonaSat01-316, apresenta 66% de similaridade com satDNA FvarSat01-306, previamente descrito em *F. varia* (Vignati et al., 2025) podendo ser classificado como da mesma superfamília.

1 Tabela 3 - Características das famílias de satDNA identificadas nos genomas de quatro espécies de *Partamona*: *P. ailyae* (Paily) do clado A, e *P.*
 2 *helleri* (Phel), *P. chapadicola* (Pchap), e *P. cupira* (Pcup) do clado B. SF: superfamília. CM: Comprimento do monômero. AT (%): Conteúdo de
 3 bases AT.

| Família de satDNA | SF | ML | A + T (%) | Abundância (%) | | | | Divergência (%) | | | |
|--------------------|----|-----|-----------|----------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|-------|-------|-------|
| | | | | Paily | Phel | Pcha | Pcup | Paily | Phel | Pcha | Pcup |
| PartamonaSat01-316 | | 316 | 63,3 | 2,221 | 7,705 | 8,595 | 9,381 | 6,41 | 3,13 | 2,88 | 2,91 |
| PartamonaSat02-627 | | 627 | 41,3 | 0,188 | 0,094 | 0,173 | 1,604 | 10,88 | 9,33 | 10,02 | 2,95 |
| PartamonaSat03-145 | 1 | 145 | 57,2 | 0,112 | 0,063 | 0,061 | 0,06 | 20,72 | 20,91 | 20,49 | 20,41 |
| PartamonaSat04-78 | | 78 | 82,1 | 0,045 | 0,011 | 0,028 | 0,016 | 16,74 | 19,55 | 17,27 | 18,9 |
| PartamonaSat05-287 | | 287 | 56,4 | 0,01 | 0,012 | 0,011 | 0,009 | 8,35 | 7,13 | 6,21 | 6,51 |
| PartamonaSat06-145 | 1 | 145 | 57,2 | 0,027 | 0,014 | 0,015 | 0,013 | 18,44 | 18,53 | 17,46 | 19,73 |
| PartamonaSat07-580 | | 580 | 68,4 | 0,008 | 0,013 | 0,013 | 0,014 | 12,99 | 7,54 | 10,43 | 10,03 |
| PartamonaSat08-140 | | 140 | 44,3 | 0,001 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 8,31 | 7,09 | 6,17 | 7,07 |
| TOTAL | | | | 2,612 | 7,915 | 8,900 | 11,103 | | | | |

Em relação à divergência das sequências, os menores valores foram observados para o satDNA mais abundante, PartamonaSat01-316, sendo 6,41% em *P. ailyae*, 2,91% em *P. cupira*, 2,88% em *P. chapadicola* e 3,13% em *P. helleri*. Os maiores valores de divergência foram registrados para o PartamonaSat03-145 em todas as espécies analisadas (Tabela 3). Além disso, constatamos que a divergência do satDNA PartamonaSat01-316 foi inversamente proporcional à sua abundância. Em *P. ailyae*, espécie na qual esse satDNA apresentou a menor abundância (2,221%), foi observado o maior valor de divergência (6,41%), enquanto, nas demais espécies, o maior valor registrado foi de 3,13% em *P. helleri* (Tabela 2).

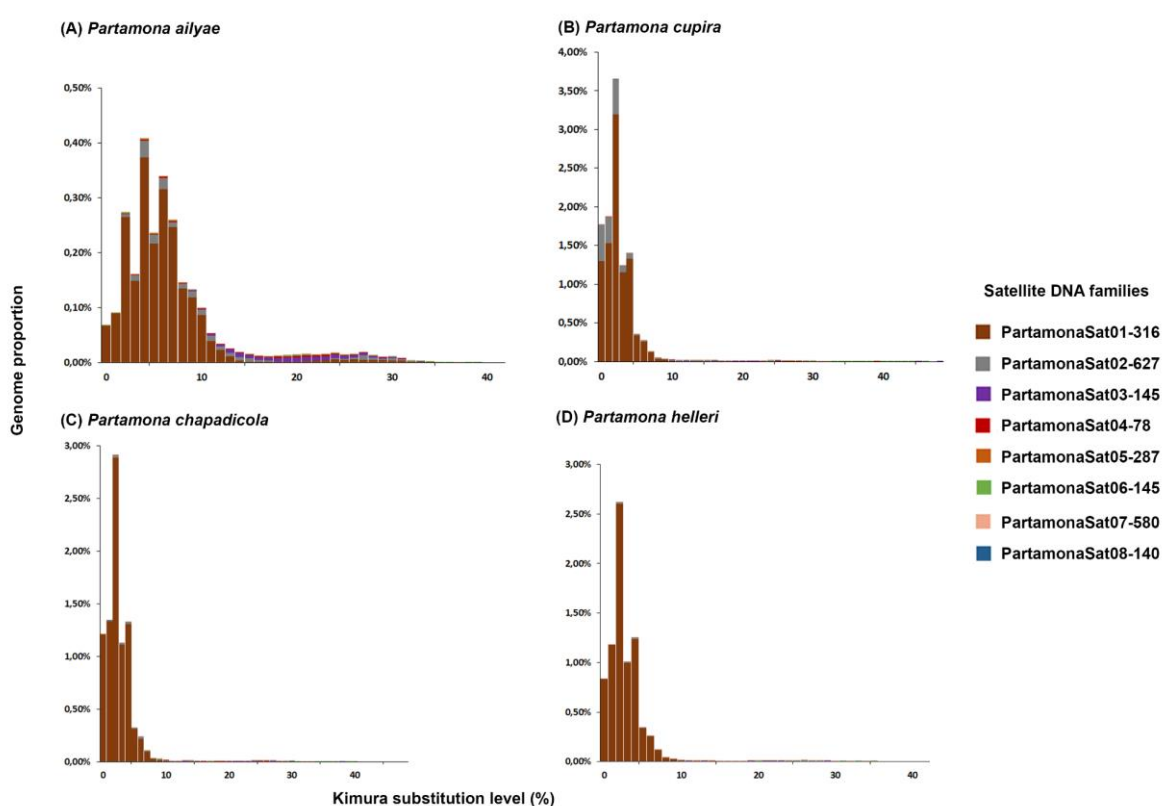


Figura 1 - Landscape (abundância versus divergência) para as famílias de satDNAs identificados nos genomas de quatro espécies de *Partamona*: (A) *P. ailyae*. (B) *P. helleri*. (C) *P. chapadicola*. (D) *P. cupira*. Note a predominância da família PartamonaSat01-316 em relação aos demais satDNAs nos genomas das quatro espécies.

A análise da landscape (abundância versus divergência) revelou que o satDNA PartamonaSat01-316 apresentou um pico de abundância em baixa divergência, inferior a 5%, em *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri* (Figura 1B-D), indicando amplificação recente desse satDNA nessas espécies. Todavia, observamos que esse mesmo satDNA, em *P. ailyae*, apresentou um maior achatamento da curva de distribuição da paisagem repetida, sugerindo o

acúmulo de mutações (Figura 1A). Em *P. cupira*, verificamos ainda a amplificação do satDNA PartamonaSat02-627, com divergência predominantemente inferior a 5% (Figura 1B).

Analisamos a presença do satDNA PartamonaSat01-316 em *P. rustica*, que apresentou sinais de hibridização nos centrômeros de todos os cromossomos e na heterocromatina pericentromérica de alguns pares. Além disso, o braço curto de todos os cromossomos submetacêntricos foi marcado (Figura 2A).

Em *P. chapadicola*, a sonda PartamonaSat01-316 marcou os centrômeros de todos os cromossomos e grande parte da heterocromatina na região pericentromérica de um dos braços da maioria dos cromossomos. Além disso, o primeiro par de cromossomos submetacêntrico apresentou duas marcações: uma centromérica e outra na região terminal do braço maior (Figura 2B).

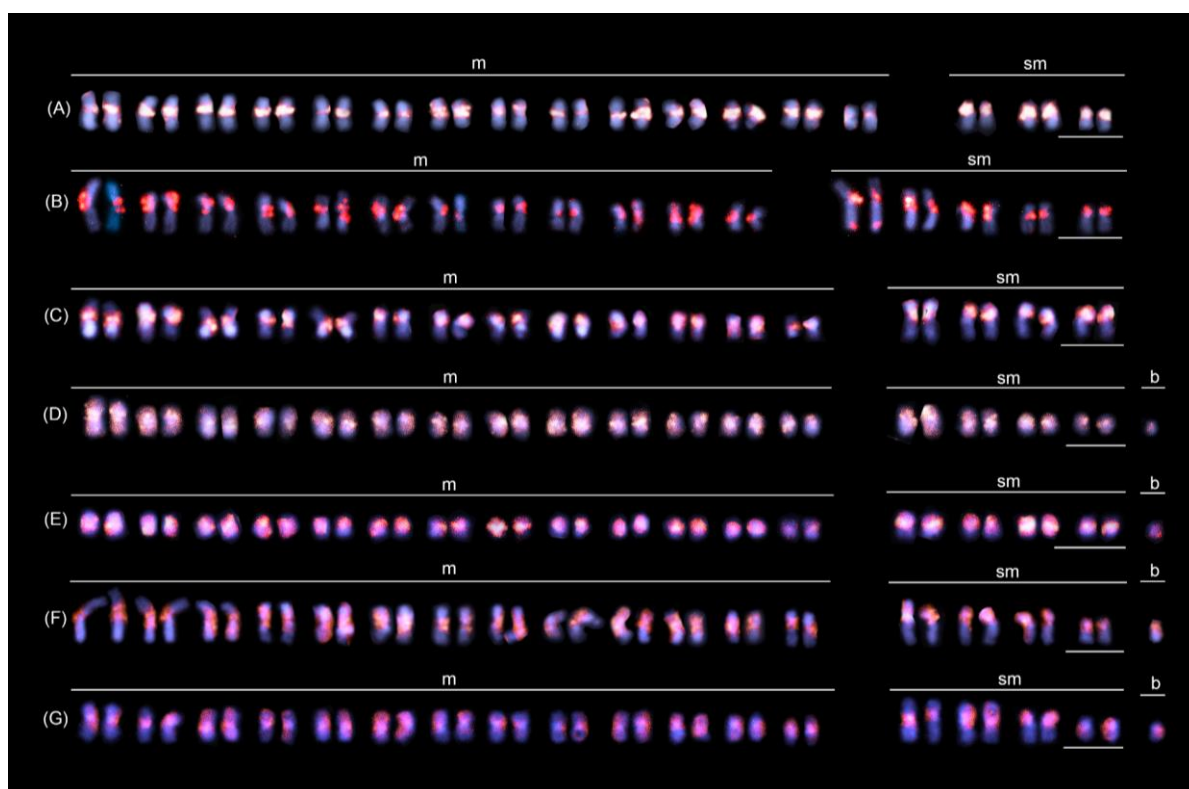


Figura 2 - Distribuição cromossômica da família de mais abundante, satDNA PartamonaSat01-316 (regiões vermelhas), mapeada por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em espécies de abelhas *Partamona*: (A) *P. rustica*, (B) *P. chapadicola* e (C) *P. helleri* sem cromossomos B e *P. helleri* com cromossomos B de diferentes localidades: (D) Natividade, (E) Porciúncula, (F) Ponte Nova e (G) Governador Lindenberg. Barras = 5µm.

Em todas as populações analisadas de *P. helleri*, foram encontrados indivíduos com cromossomos B. As análises de FISH com a sonda produzida a partir do satDNA PartamonaSat01-316 em cromossomos desta espécie mostraram sinais de hibridização nas regiões de heterocromatina pericentromérica e no centrômero dos cromossomos do complemento A (Figura 2C). Além disso, todos os cromossomos B foram marcados (Figuras 2D-G e 3A-F), especialmente os cromossomos B maiores encontrados em indivíduos das populações de Jaguaré e Macarani. Nesses indivíduos, observamos uma marcação bem mais evidente, indicada pela forte intensidade do sinal de FISH na região de heterocromatina, porém não em toda a sua extensão (Figuras 3C, E, F).

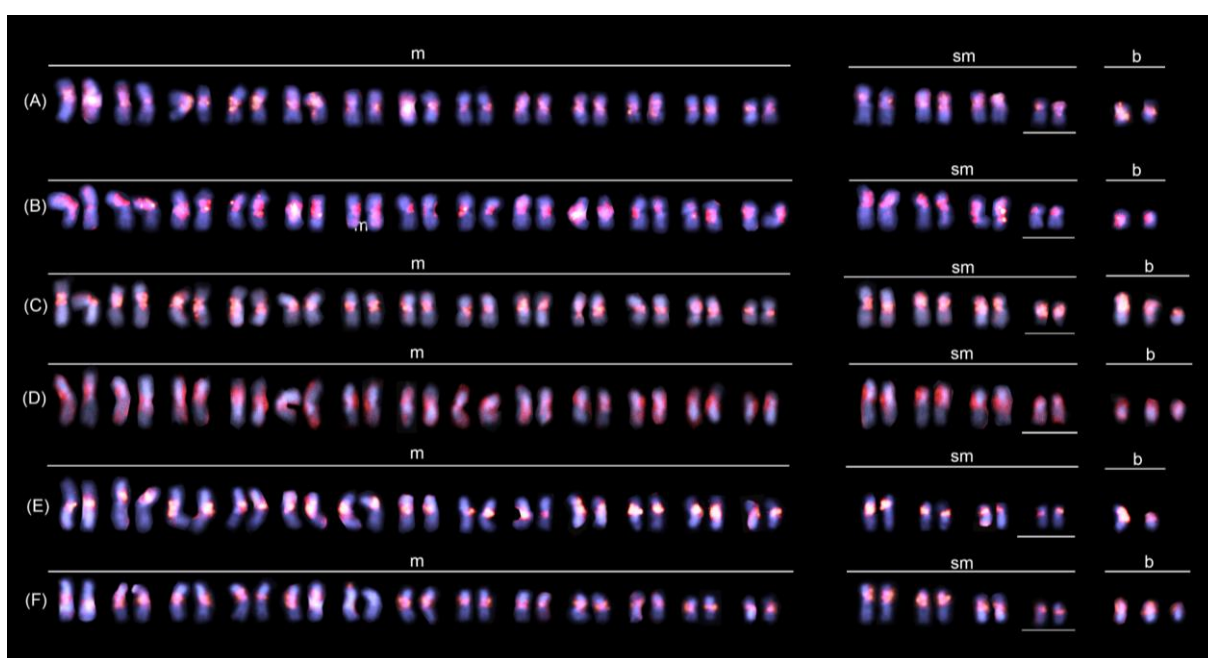


Figura 3 -Distribuição cromossômica da família de mais abundante, satDNA PartamonaSat01-316 (regiões vermelhas), mapeada por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em populações de *P. helleri* com cromossomos B: (A-C) Jaguaré, (D) Santa Teresa e (E-F) Maracani. Barras = 5 μ m.

4 DISCUSSÃO

A análise do satelitoma de quatro espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Partamona* mostrou variação na quantidade de satDNA no genoma, mesmo entre espécies do mesmo gênero. Essas variações na abundância de satDNA no genoma já foram observadas em outros insetos, como drosófilas e gafanhotos (Lima; Ruiz-Ruano, 2022; Camacho *et al.*, 2022). Em *Drosophila*, por exemplo, o conteúdo de satDNA variou de 0,54% no genoma de *D. arizonae* a 38,8% em *D. albomicans* (Lima; Ruiz-Ruano, 2022). Em abelhas do gênero *Melipona*, Pereira *et al.* (2021) relataram uma grande diferença na proporção de satDNA no genoma: em *M. scutellaris*, o satDNA representou 38,41%, enquanto em *M. quadrifasciata* foi de apenas 2,83%. Segundo Lima e Ruiz-Ruano (2022), a variação no conteúdo de satDNA do genoma frequentemente segue um sinal filogenético.

De acordo com as filogenias moleculares de *Partamona* (Novaes *et al.*, 2021; Miranda *et al.* 2025), o gênero é dividido em dois clados principais, sendo *P. ailyae* pertencente ao clado A e *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri* ao clado B. A espécie *P. rustica* que pela filogenia de Novaes *et al.* (2021) pertencia ao mesmo clado de *P. ailyae* agora passa a fazer parte do clado B, juntamente a *P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri*. A análise genômica de satDNA mostrou que as espécies do clado B possuem uma quantidade superior a três vezes a de satDNA encontrada em *P. ailyae*, pertencente ao clado A. No gênero *Melipona*, que é composto por um grupo de espécies com baixo conteúdo de heterocromatina (menos de 50%) e outro com alto teor de heterocromatina (mais de 50%) (Rocha; Pompolo, 1998), Pereira *et al.* (2021) mostraram que há grande diferença na quantidade de satDNA entre espécies desses grupos.

Apesar da variação na proporção de satDNA no genoma (Tabela 3), identificamos oito famílias de satDNA nas quatro espécies, indicando que a quantidade de satDNA não está relacionada ao número de famílias de satDNA (Pereira *et al.*, 2021). No caso do gênero *Partamona*, a espécie *P. ailyae*, mesmo possuindo o mesmo número de famílias de satDNA que as demais espécies analisadas, apresenta uma fração de satDNA em seu genoma muito menor do que nas demais espécies do gênero. Embora não tenham sido observadas diferenças qualitativas em relação às famílias de satDNA presentes nas espécies de clados diferentes, verificamos que as espécies do clado B (*P. cupira*, *P. chapadicola* e *P. helleri*) parecem possuir uma maior quantidade de satDNA no genoma, e essa maior quantidade está relacionada principalmente à abundância do satDNA PartamonaSat01-316, que é o satDNA mais abundante nas quatro espécies. Esses resultados contrastam com os obtidos por Pereira *et al.* (2021) e

Pereira, Cabral-de-Melo e Lopes (2023), em que o satDNA mais abundante varia entre espécies de clados diferentes dentro dos gêneros *Melipona* e *Trigona*. O gênero *Partamona* se diversificou há aproximadamente 5 Ma, enquanto em *Trigona* e *Melipona* ocorreu a aproximadamente 19 e 24 Ma, respectivamente (Rasmussen; Cameron, 2010). O tempo muito menor de separação das espécies de *Partamona* poderia explicar por que a biblioteca ainda não mudou qualitativamente. Contudo, é essencial que outras espécies de *Partamona* sejam estudadas para confirmar se essa diferença quantitativa realmente se relaciona com a filogenia do gênero. De acordo com Palacios-Gimenez *et al.* (2020), as mudanças evolutivas na abundância e divergência de satDNA refletem se relacionam diretamente a filogenia das espécies e as diferenças observadas na abundância de satDNA e na sequência de nucleotídeos são proporcionais ao tempo porque elas compartilharam seu último ancestral comum.

O enriquecimento de AT observado nos satDNAs de *Partamona* corrobora uma tendência já descrita para outras abelhas da tribo Meliponini (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025). Porém, em outros grupos como drosófilas, o conteúdo de guanina-citosina (GC) das sequências de satDNA varia amplamente, de 9,1% a 71,8%, apesar disso, essas sequências tendem a ser ricas em AT (Lima; Ruiz-Ruano, 2022). Em insetos, o satDNA rico em AT é recorrente, sendo sugerido que contribua para a curvatura do DNA, aumentando, assim, a estabilidade do nucleossomo (revisado por Palomeque; Lorite, 2008).

O comprimento das sequências variou de 140 a 627 pb. O satDNA mais abundante, PartamonaSat01-316, apresentou 316 pb de comprimento. Esse comprimento de monômero é muito semelhante ao dos satDNAs mais abundantes das abelhas *T. hyalinata* e *Frieseomelitta varia*, que apresentaram 301 e 306 pb, respectivamente (Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025), correspondendo aproximadamente ao tamanho de dois nucleossomos. Monômeros com comprimentos entre 150-180 pb e 300-360 pb parecem ser comuns em muitos DNAs satélites e podem ser considerados evolutivamente favorecidos (por exemplo, em insetos; Palomeque; Lorite, 2008). Ao compararmos as sequências desses três satDNAs recuperadas pelo *RepeatExplorer2*, verificamos que o satDNA PartamonaSat01-316, presente no gênero *Partamona*, e o satDNA FvarSat01-306, de *F. varia*, pertencem à mesma superfamília, apresentando aproximadamente 66% de similaridade. Entretanto, o satDNA FvarSat01-306, de *F. varia*, possui uma deleção de 10 pb. Esses satDNAs apresentam uma região de aproximadamente 100 pb que parece ser conservada, com similaridade superior a 82%, ambos localizados nas regiões centromérica e pericentromérica. Essa região conservada

pode explicar por que a sonda específica do FvarSat01-306, de *F. varia*, teria hibridizado na região centromérica de *P. helleri* (Vignati *et al.*, 2025).

Ao compararmos as sequências dos satDNAs de 145 pb de *Partamona* (PartamonaSat03-145 e PartamonaSat06-145) com os satDNAs de *T. hyalinata* (ThyaSat04-145, ThyaSat06-145, ThyaSat07-145, ThyaSat08-145) (Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023), *F. varia* (FvarSat04-145, FvarSat06-145)(Vignati *et al.*, 2025), *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* (MquaSat06_MscuSat02-145, MquaSat11_MscuSat05-147, MquaSat13_MscuSat06-146, MquaSat12_MscuSat07-145, MquaSat10_MscuSat08-145 e MquaSat03_MscuSat12-146)(Pereira *et al.*, 2021) verificamos que o satDNA PartamonaSat06-145 de *Partamona* pode ser classificado na mesma superfamília que os satDNAs ThyaSat06-145 e FvarSat04-145, presentes em *T. hyalinata* e *F. varia*, respectivamente, pois apresentam mais de 60% de semelhança. Além disso, o satDNA PartamonaSat03-145 apresenta similaridade superior a 80% com os satDNAs presentes nas quatro espécies mencionadas anteriormente (ThyaSat04-145, FvarSat04-145 e MquaSat11_MscuSat05-147), sendo, portanto, considerado componentes da mesma família. Esses dados evidenciam a conservação de uma família de satDNAs entre diferentes gêneros de abelhas, que divergiram há pelo menos 56 milhões de anos (Rasmussen; Cameron, 2010).

Além disso, essa família de satDNAs não sofreu ampliação significativa em nenhuma das espécies analisadas, como demonstrado por suas baixas abundâncias, variando de 0,00167% em *M. quadrifasciata* a 0,117% em *T. hyalinata*. É provável que esses conjuntos de satDNAs, que compartilham identidade de sequência, já estivessem presentes no ancestral comum mais recente dessas espécies (Camacho *et al.*, 2022). Esses dados confirmam que nem sempre um satDNA passa por eventos de amplificação, como ocorreu nas espécies de gafanhotos *Locusta migratoria* e *Oedaleus decorus*, que, mesmo após 22,8 milhões de anos de evolução separada, compartilham um satDNA que não sofreu ampliação em nenhuma delas. Apesar de, em geral, os satDNAs ortólogos passarem por amplificação em pelo menos uma das espécies, podendo ser o mais abundante em uma e o menos abundante em outra (Camacho *et al.*, 2022). A ampla conservação evolutiva de satDNAs entre espécies de grilos após a divergência da biblioteca de satDNA aponta para uma possível funcionalidade desses elementos, uma vez que os satDNAs são compartilhados entre espécies, mas transcritos diferencialmente em diferentes partes do corpo e entre sexos (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018).

O satDNA PartamonaSat01-316, além de estar presente nas quatro espécies analisadas, é o mais abundante em todas elas. A alta representação de uma família de satDNA no genoma corrobora o que parece ser uma tendência nos *Meliponini* estudados até o momento. Em *T. hyalinata*, o genoma possui 16,565% de satDNA, sendo que o mais abundante (ThyaSat01-301) representa 13,774% da fração genômica estudada (Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023). Em *F. varia*, que possui 11,223% de satDNA, 9,971% correspondem ao satDNA FvarSat01-306 (Vignati *et al.*, 2025). O mesmo pode ser observado em *M. scutellaris*, cuja abundância de satDNA é de 38,41%, sendo 38,20% do mesmo satDNA, MscuSat01-195, amplificado nessa espécie e associado ao alto teor de heterocromatina presente nos cromossomos (Pereira *et al.*, 2021). A predominância de satDNAs na composição do genoma também é observada em outros insetos. No coleóptero *Rhynchophorus ferrugineus*, os satDNAs representam cerca de 25% do genoma, com 20,4% pertencentes à mesma família, a RferSat01-169 (Montiel *et al.*, 2022). No besouro *Hipodâmia variegata*, a análise do satelitoma revelou que 14,93% do genoma é composto por satDNA, sendo que 9,37% corresponde a um único satDNA. Os satDNAs mais abundantes em um genoma provavelmente desempenham um papel na função centromérica (Melters *et al.*, 2013).

Ademais, o satDNA PartamonaSat01-316 apresenta os menores valores de divergência, indicando que o mesmo teve amplificação recente. A análise da curva de distribuição do gráfico de Abundância versus Divergência, embora não seja uma medida absoluta de tempo, pode ser útil como um indicador do tempo desde a última amplificação de satDNA. Espera-se que a curtose e o tamanho relativo do pico sejam altos para satDNAs recentemente amplificados, enquanto valores baixos e uma curva mais achatada indicam que os satDNAs não foram amplificados recentemente. Sendo assim, o tamanho relativo do pico e a curtose indicam também se esse satDNA está distante de se degenerar (Camacho *et al.*, 2022).

A investigação da presença e distribuição do satDNA PartamonaSat01-316 em *P. rustica* revelou que os sinais positivos coincidem com as regiões pericentroméricas e com os centrômeros, além do braço curto de alguns pares (Figura 2A), coincidindo com a região de heterocromatina (Novaes *et al.*, 2021). Apesar de a filogenia de Novaes *et al.* (2021) propor que *P. rustica* pertença ao clado A, verificamos que a distribuição do satDNA Partmona01-316 em toda a heterocromatina se assemelha ao observado em *P. helleri* ((Figura 2C, Figura 3A-F). Esses dados reforçam o que é proposto pela filogenia de Miranda *et al.* (2025), que *P. rustica* seja reposicionada na filogenia, no mesmo clado de *P. helleri*.

Em *P. chapadicola*, a heterocromatina está distribuída ao longo de um dos braços cromossômicos (Lopes *et al.*, 2020). Os sinais da sonda do satDNA PartamonaSat01-316 marcaram os centrômeros de todos os cromossomos, a região pericentromérica e quase todo o braço da maioria dos cromossomos, indicando que este satDNA é um dos principais componentes da heterocromatina, mas não o único (Figura 2B). A heterocromatina além de satDNA, também pode ser enriquecida em elementos transponíveis (revisado por Grewal; Jia, 2007; Allshire; Madhani, 2018) e essas duas classes de elementos repetitivos podem contribuir com diferentes frações do genoma, por exemplo no gênero *Drosophila*, em que no subgênero *Drosophila* o tamanho genoma impulsionado pela modulação de sequências de SatDNA, enquanto o elemento transponível é um fator mais prevalente em *Sophophora* (Lima Ruiz-Ruano, 2022). Em Meliponini, a produção de uma sonda a partir de microdissecção de um fragmento cromossômico em região de heterocromatina de *Tetragonisca febrigi*, mostrou sinais de hibridização em regiões heterocromáticas de todos os cromossomos, contudo, não marcou toda a heterocromatina, indicando que esta não é a única sequência ali presente. Assim, uma hipótese é que em *P. chapadicola*, a heterocromatina possa ser constituída também por outros tipos de sequências, como por exemplo, os elementos transponíveis.

Em *P. helleri*, a heterocromatina ocupa a região centromérica e as regiões pericentroméricas de cromossomos do complemento A, além de se estender por quase toda a extensão dos cromossomos B (Martins *et al.*, 2014). Nossas análises de FISH com a sonda do satDNA PartamonaSat01-316 mostraram sinais de hibridização nessas mesmas regiões, o que confirma que este satélite é o principal componente da heterocromatina nessa espécie (Figura 2C, Figura 3A-F). Os sinais da sonda foram observados em todos os cromossomos B, independentemente do tamanho e da população de origem. No entanto, nos cromossomos B maiores, encontrados em indivíduos das populações de Jaguaré e Macarani, observamos que o sinal de FISH foi mais forte e se estendia por maior extensão desses cromossomos (Figura 2C, E, F). Esse resultado sugere que a amplificação do satDNA Partmona01-316 poderia justificar esses cromossomos de tamanho maior nessas populações. Martins *et al.* (2014), ao investigar a origem dos cromossomos B de *P. helleri*, produziram uma sonda por dissecção do cromossomo B1, mas não encontraram homologia com qualquer sequência de cromossomos A. Nossos resultados indicam que, pelo menos, a composição da heterocromatina é compartilhada entre os cromossomos do complemento A e B.

Em gafanhotos, cromossomos B heterocromáticos, enriquecidos com diferentes famílias de satDNA compartilhadas com os cromossomos A, também foram observados. Na

espécie *Rhammatocerus brasiliensis*, esses cromossomos B continham uma sequência de satDNA compartilhada exclusivamente com um par de cromossomos A, corroborando a hipótese de origem intraespecífica a partir do par cromossômico número 11 (Milani *et al.*, 2018).

O estudo das sequências repetitivas é fundamental, especialmente em espécies com grande abundância de repetições, pois essas sequências podem gerar lacunas e outros problemas em projetos de montagem de genomas. Essas lacunas são problemáticas, pois as áreas cromossômicas peri/centroméricas e os braços curtos de cromossomos acrocêntricos contêm grandes matrizes de satDNAs. Portanto, é essencial um conhecimento prévio da composição, localização e distribuição cromossômica de sequências repetitivas, incluindo os satDNAs (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que nosso objetivo era fornecer dados que contribuam para esclarecer a origem e a composição dos cromossomos B, bem como oferecer informações que auxiliem na compreensão das relações filogenéticas desse grupo por meio da análise do satelitoma, nossos resultados mostraram que, no gênero *Partamona*, não há diferenças qualitativas entre a biblioteca de satDNA das espécies dos cladus A e B. No entanto, observamos diferenças quantitativas que sugerem que as espécies do clado A podem conter um menor teor satDNA.

O satDNA desempenha um papel importante na composição e evolução da heterocromatina em Meliponini, e o elemento PartamonaSat01-316 está presente em todas as espécies de *Partamona* analisadas. Esse satDNA pode ser o principal componente dos cromossomos B de *P. helleri*, especialmente nos cromossomos B maiores, encontrados em populações da Bahia e do norte do Espírito Santo.

A distribuição do satDNA PartamonaSat01-316 em *P. rustica* e *P. helleri* reforçam a ideia de maior proximidade filogenética do que era estimado anteriormente.

Novos esforços são necessários para investigar a presença e distribuição desse satDNA em outras espécies de *Partamona*, tanto naquelas que possuem cromossomos B quanto naquelas que não os apresentam.

REFERÊNCIAS

- ALLSHIRE, R. C.; MADHANI, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 229-244, 2018.
- ALT SCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BAO, W.; KOJIMA, K. K.; KOHANY, O. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. **Mobile DNA**, v. 6, p. 1–6, 2015.
- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, v. 28, p. 369-380, 2020.
- BRITO, R. M.; COSTA, M. A.; POMPOLO, S. G. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 185-188, 1997.
- CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 36, 2022.
- COSTA, M. A.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, n. 4, p. 801-806, 1992.
- DODSWORTH, S. *et al.* Genomic repeat abundances contain phylogenetic signal. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 112–126, 2015.
- DRUMMOND, A. *et al.* **Geneious v4.8. 2009**. Disponível em: <http://geneious.com>. Acesso em: set. 2024.
- ELIZEU, A. M. *et al.* Comparative study on the physical mapping of ribosomal genes and repetitive sequences in *Friesella schrotkyi* (Friese 1900) (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Zoologischer Anzeiger**, v. 292, p. 225-230, 2021.
- FU, J. *et al.* Identification and characterization of abundant repetitive sequences in *Allium cepa*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 16756, 2019.
- GONÇALVES, G. C. *et al.* Comparative cytogenetic analysis of three species of the genus *Partamona* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 80-88, 2021.
- GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 2007.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal of Genetics**, v. 63, p. 159-185, 1988.
- KIM, Y. B. *et al.* Divergence of *Drosophila melanogaster* repeatomes in response to a sharp microclimate contrast in Evolution Canyon, Israel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 10630–10635, 2014.

- LIMA, L. G. de; RUIZ-RUANO, F. J. In-depth satellitome analyses of 37 *Drosophila* species illuminate repetitive DNA evolution in the *Drosophila* genus. **Genome Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. evac064, 2022.
- LOPES, D. M. *et al.* Different levels of chromatin condensation in *Partamona chapadicola* and *Partamona nhambiquara* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, p. 206–213, 2020.
- MACHADO, D. P. *et al.* Occurrence and origin of supernumerary chromosomes in *Partamona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 1, p. 68–75, 2016.
- MARTHE, J. B. *et al.* Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 253–255, 2010.
- MARTINS, C. C. C. *et al.* Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. **Apidologie**, v. 44, p. 75–81, 2014.
- MARTINS, C. C. *et al.* New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 782–785, 2009.
- MELTERS, D. P. *et al.* Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome Biology**, v. 14, R10, 2013.
- MILANI, D. *et al.* Satellite DNAs unveil clues about the ancestry and composition of B chromosomes in three grasshopper species. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 523, 2018.
- MONTIEL, E. E. *et al.* Satellitome of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), the most diverse among insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 826808, 2022.
- MORA, P. *et al.* Making the genome huge: The case of *Triatoma delpontei*, a Triatominae species with more than 50% of its genome full of satellite DNA. **Genes**, v. 14, p. 371, 2023.
- MORA, P. *et al.* Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, v. 11, n. 7, p. 783, 2020.
- NOVAES, C. M. *et al.* Chromosome evolution in the genus *Partamona* (Apidae: Meliponini), with comments on B chromosome origin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 161, n. 10–11, p. 520–528, 2021.
- NOVÁK, P. *et al.* TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, e111, 2017.
- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3745–3776, 2020.
- PAÇO, A. *et al.* The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 427–440, 2015.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. **DNA Research**, v. 25, n. 2, p. 137-147, 2018.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* Eight million years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the ins and outs of the library hypothesis. **Genome Biology and Evolution**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 88–102, 2020.

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

PEDRO, S. R.; CAMARGO, J. M. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, p. 1-117, 2003.

PEREIRA, J. A. *et al.* The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high-throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, v. 130, p. 251-262, 2021.

PEREIRA, J. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The satellite DNAs populating the genome of *Trigona hyalinata* and the sharing of a highly abundant satDNA in *Trigona* genus. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 418, 2023.

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.

RASMUSSEN, C.; CAMARGO, J. M. A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* s.s. (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 102-118, 2008.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, A. S. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 206-232, 2010.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: MELO, G. A. R.; SANTOS, I. A. (Eds.). **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: UNESC, 2003. p. 311-320.

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

SILVA, B. S. M. L. *et al.* 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, n. 12, e0223466, 2019.

SILVA, M. J. *et al.* Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, p. 141-147, 2020.

SMIT, A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015. 2017. Disponível em: <http://www.repeatmasker.org/>.

TAVARES, M. G. *et al.* Comparative molecular cytogenetics in five species of stingless bees (Hymenoptera, Apidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 302, p. 37-42, 2023.

TAVARES, M. G.; LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 241–258, 2017.

TEIXEIRA, G. A.; AGUIAR, H. J. A. C.; PETITCLERC, F.; ORIVEL, J.; LOPES, D. M.; BARROS, L. A. C. Evolutionary insights into the genomic organization of major ribosomal DNA in ant chromosomes. **Insect Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 340–354, 2021.

TOSTA, V. C. *et al.* Possible introgression of B chromosomes between bee species (genus *Partamona*). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 144, n. 3, p. 220-226, 2014.

VIGNATI, Z. B. M. *et al.* Cytogenomics of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae) and the sharing of a satellite DNA family in several Neotropical Meliponini genera. **Genes**, v. 16, n. 1, p. 86, 2025.

VITALES, D.; GARCIA, S.; DODSWORTH, S. Reconstructing phylogenetic relationships based on repeat sequence similarities. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 147, p. 106766, 2020.

WANG, S.; LORENZEN, M. D.; BEEMAN, R. W.; BROWN, S. J. Analysis of repetitive DNA distribution patterns in the *Tribolium castaneum* genome. **Genome Biology**, v. 9, R61, 2008.

4 CAPÍTULO 03: ANÁLISE COMPARATIVA DO SATELITOMA DE SEIS ESPÉCIES DE ABELHAS DO GÊNERO *Bombus* LATREILLE, 1802.

Análise do satelitoma de seis espécies de abelhas do gênero *Bombus* Latreille

Zulemara Boldrini Manhago Vignati

Resumo: O gênero *Bombus* que possui atualmente cerca de 294 espécies de abelhas em todo o mundo, subdividido em 15 subgêneros. Na tribo Meliponini, grupo irmão de Bombini, o estudo de satDNAs têm mostrado que em geral um satélite que é mais abundante no genoma predomina na heterocromatina das espécies. Neste trabalho realizamos uma análise genômica em seis espécies do gênero *Bombus*, com o objetivo de caracterizar o satelitoma das espécies *B. turneri*, *B. bohemicus* e *B. skorikovi*, pertencentes ao subgênero *Psithyrus* e *B. ardens*, *B. v. nearcticus* e *B. vosnesenskii* do subgênero *Pyrobombus*, em termo de diversidade, abundância e divergência. Investigamos se a biblioteca de satDNA dessas espécies segue os mesmos padrões observados em Meliponini. Nossa análise mostrou que o satelitoma é composto por 100 famílias de satDNA, sendo a maioria compartilhados por todas as espécies. A quantidade de satDNA no genoma variou de 11,0878% a 24,1019%. Assim como em Meliponini, na maioria das espécies a proporção de satDNA está associada à abundância de um satDNA, nesse caso o BombusSat19-30, que é compartilhado por todas as espécies, e apresenta divergência média de 16,67%. Os valores altos de divergência desse satDNA indicam ausência de amplificação recente. Entretanto, a alta abundância na maioria das espécies sugere que já seria muito abundante no ancestral dessas mesmas. A espécie *B. turneri*, apresentou um padrão diferente do observado nas demais espécies de *Bombus* e de Meliponini. Nessa espécie, cinco satDNA diferentes apresentaram abundância similar e predominantes no genoma.

Palavras-chave: RepeatExplorer; satDNA; Genoma e Bombini

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Bombus* Latreille 1802, compõe a tribo Bombini, uma das quatro tribos de abelhas corbiculadas. De acordo com as filogenias moleculares, Bombini tem como grupo irmão as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini (Cameron; Hines; Williams, 2007; Rasmussen; Cameron, 2010; Almeida *et al.*, 2023; Lepeco *et al.*, 2024). A estimativa atual é que existam cerca de 294 espécies em todo o mundo (Williams *et al.*, 2023), sendo a maioria dessa diversidade encontrada na Ásia (Williams; Jepsen, 2014), principalmente em regiões frias. Isso é possível devido a características como: capacidade de termorregulação, capacidade de hibernar (Heinrich, 1979 *apud* Williams; Lobo; Messenger, 2018), usar locais de nidificação que são termicamente isolados por serem frequentemente subterrâneos e usar material de ninho deixado por outros animais (Williams *et al.*, 2008).

Quase todos os subgêneros de *Bombus* estão agrupados em dois grandes clados principais, que diferem principalmente com relação a diferenças associadas a morfologia da cabeça, sendo um clado o “*short-faced*” e outro o “*long-faced*”. As espécies do novo mundo estão incluídas no grande clado “*short-faced*” (Cameron; Hines; Williams, 2007). Para facilitar o estudo desse gênero, Williams *et al.* (2008) propuseram uma classificação simplificada para os subgêneros, considerando que as chaves para subgêneros eram difíceis de usar e não funcionavam bem para muitas espécies. Essa simplificação reduziu de 38 para 15 subgêneros monofiléticos.

Inicialmente, acreditava-se que os satDNA eram específicos da espécie (Bachmann *et al.*, 1993). Contudo, diversos estudos, incluindo Meliponini, grupo irmão de Bombini, demonstraram que essas sequências podem ser compartilhadas por espécies do mesmo gênero e também de gêneros diferentes (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025). O satDNA compartilhado pode representar frações diferentes no genoma de cada espécie (Pereira *et al.*, 2021). Outra tendência observada é que, uma família de satDNA está consideravelmente mais representada no genoma em comparação com as demais (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral-de-Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025) e não apenas em abelhas, mas também em outros insetos como coleópteros (Montiel *et al.*, 2022; Mora *et al.*, 2020), ortópteros (Ruiz-Ruiano *et al.*, 2018). No gênero *Melipona*, por exemplo, em *Melipona scutellaris* o saDNA mais abundante representa 38,41% do genoma analisado, que corresponde a 99,46% do total de satDNA (Pereira *et al.*, 2021).

A partir da análise de informações das sequências repetitivas que compõem o genoma é possível propor hipóteses de relações evolutivas congruentes com análises sistemáticas baseadas em marcadores de DNA comumente usados (Dodsworth *et al.*, 2015; Vitales; Garcia; Dodsworth, 2020). O que torna o estudo dessas sequências uma ferramenta para agregar aos estudos de filogenia. Um estudo com 37 espécies de drosófilas, Lima e Luiz-Ruano (2022) mostraram que apesar do conteúdo de satDNA variar entre as espécies, ele frequentemente segue um sinal filogenético.

No gênero *Bombus*, o único trabalho até o momento, envolvendo satDNA, foi conduzido na espécie *Bombus terrestris*. Nesse estudo, uma família de satDNA foi descrita em relação a suas características estruturais e transcricionais, bem como seu potencial envolvimento no processo de diferenciação. A família de satDNA descrita contém 420 pb com 57% de bases AT e teria se originado de um motivo ancestral de 29 pb. Essa análise mostrou diferenças nas quantidades de satDNA nos genomas de fêmeas (rainha e operária) e machos, que foi atribuída a perdas de DNA cromossômico durante o desenvolvimento dos machos. Além disso, a transcrição diferencial desse satDNA em embriões adultos, sugere possível papel deste no desenvolvimento desses organismos. A divergência média da sequência de ácido nucleico entre cada par de monômeros foi de 11,1% (Rouleux-Bonnin; Bigot; Bigot, 2004).

Embora os genomas de diversas espécies tenham sido disponibilizados em bancos de dados nos últimos anos, alguns até mesmo montados (Heraghty *et al.*, 2020; Crowley; Sivell., 2023; Koch *et al.*, 2024), pouco se sabe sobre o satelitoma das espécies deste gênero. O satDNA ainda é um componente pouco representado nos projetos de sequenciamento genômico (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016), sendo geralmente removidos das análises em função do desafio que representam para montagem do genoma (Vitales; Garcia; Dodsworth, 2020; Paula-Freitas *et al.*, 2020; Sam *et al.*, 2022). Atualmente, a disponibilidade de ferramentas de bioinformática que utilizam os dados brutos gerados do sequenciamento genômico como o *Repeat Explorer*, facilitam os estudos das sequências repetitivas, e, portanto, oferecem a oportunidade para estudar e comparar o satDNA das espécies desse gênero com ampla distribuição geográfica. Conhecer de forma mais detalhada as sequências repetitivas é importante para uma compreensão mais completa dos genomas (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo, caracterizar o satelitoma de seis espécies do gênero *Bombus*, em termos de diversidade, abundância e divergência, e verificar se a biblioteca dessas espécies de *Bombus* segue os padrões observados em Meliponini.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção das sequências

Os genomas de seis espécies de abelhas do gênero *Bombus* foram obtidos na plataforma pública *Sequence Read Archive (SRA)/ National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (Tabela 01).

Tabela 1 - Espécies do gênero *Bombus* utilizadas para análises genômicas neste estudo, seus respectivos subgêneros e códigos de acesso SRA/NCBI.

| Subgênero | Espécies | Código de Acesso (SRA/NCBI) |
|------------------|---|-----------------------------|
| <i>Psithyrus</i> | <i>Bombus turneri</i> (Richards, 1929) | SRX9017904 |
| | <i>Bombus bohemicus</i> Seidl, 1838 | SRX9241221 |
| | <i>Bombus skorikovi</i> (Popov, 1927) | SRX9241220 |
| Pyrobombus | <i>Bombus ardens</i> Smith, 1879 | SRX19186966 |
| | <i>Bombus vancouverensis nearcticus</i> Cresson, 1878 | SRX7270440 |
| | <i>Bombus vosnesenskii</i> Radoszkowski 1862 | SRX18758709 |

2.1 Identificação dos satDNAs

A identificação e caracterização dos satDNAs presentes nos genomas das seis espécies, foi realizada pelo pipeline RepeatExplorer2 (Galaxy Version 2.3.7), disponível na plataforma pública <https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy> (acessado em março de 2024), seguindo o protocolo de Novák, Neumann e Macas (2020). Inicialmente as leituras brutas no formato FASTQ foram pré-processadas para verificação de qualidade, remoção de adaptadores e entrelaçamento de leituras emparelhadas em um arquivo no formato FASTA. Em seguida, uma amostra aleatória de 1.000.000 de *reads* foi utilizada para identificar as famílias usando as ferramentas *RepeatExplorer2 clustering* e *Tandem Repeat Analyzer (TAREN)* (Novák; Neumann; Maca, 2020). As sequências identificadas foram comparadas com sequências depositadas no *Repbase* v20.10. e nas bases de dados GenBank/NCBI DNA com a ferramenta BLASTn para identificar possíveis semelhanças.

Para estimar abundância e divergência de cada satDNA foi utilizado a ferramenta *RepeatMasker* (Smit; Hubley; Green, 2007) usando o *Cross match*. A abundância de cada

satDNA foi estimada em relação à proporção que ocupa no genoma e a divergência foi calculada através do parâmetro Kimura 2 (K2P) e usando o *script calcDivergenceFromAlign.pl* no *software RepeatMasker* (Smit; Hubley; Green, 2007). A homologia entre as famílias satDNA foi verificada por meio do software Geneious v4.8 (Drummond *et al.*, 2009). Os satDNAs identificados foram nomeados em ordem decrescente de abundância em relação à *Bombus turneri*, por se tratar da espécie com maior número de satDNA compartilhados. Para os três satDNA compartilhados ausentes nessa espécie, consideramos a abundância de *Bombus ardens* para identificar, pois é a espécie que possui os mesmos. Para os satDNA exclusivos consideramos a abundância de cada espécie, seguindo Ruiz-Ruano *et al.* (2016) sendo classificados como da mesma família aqueles com identidade superior a 80%.

3 RESULTADOS

A análise do satelitoma das seis espécies de *Bombus* mostrou a existência de 100 famílias de satDNAs, dessas, 75 estão presentes em todas as espécies, 17 são compartilhados por algumas espécies e oito são exclusivos de determinada espécie. Verificamos ainda que o satDNA BombusSat88-51 é compartilhado apenas por espécies do subgênero *Psithyrus*, enquanto o BombusSat91-81 pelas do subgênero *Pyrobombus*. Comparamos também os satDNA de biblioteca de *Bombus* com os satDNA de Meliponini descritos anteriormente por Pereira (2022), Vignati *et al.* (2025) e Vignati *et al.* (dados não publicados) e não encontramos semelhanças com esses satDNAs.

A quantidade total de satDNA nos genomas analisados variou de 11,0878% em *B. turneri* a 24,1020% em *B. skorikovi*. A divergência apresentou uma ampla variação, de 0,64 a 38,69%. O comprimento dos monômeros variou de 12 pb (BombusSat72-12) a 13864 pb (BombusSat31-13864), ambos os satDNAs presentes em todas espécies analisadas (Tabela 2).

No geral, o conteúdo AT variou amplamente 35,3% a 92,1%, com média de 60,787% e desvio padrão de 9,91%. Entre os satDNAs compartilhados, a variação no conteúdo AT foi de 35,3 a 83% em todas as espécies, com média de 59,53% de AT. Considerando apenas os oito satDNAs não compartilhados a média de AT é de 75,225%. Das 100 famílias encontradas, 90 têm mais de 50% de conteúdo AT.

Com relação à divergência, dos 92 compartilhados, 65 possuem divergência superior a 10% em todas as espécies em que estão presentes, enquanto entre os oito satDNA exclusivos, somente os satDNAs BturSat01-255 e BturSat02-156, presentes no genoma de *B. turneri* apresentam valores de divergência superiores a 10% (Tabela 2).

Em *B. turneri* o satDNA compreende 11,0878% do genoma, distribuído em 91 famílias, sendo 1,5405% do satDNA BombusSat01-4996, o mais abundante e que possui 4996pb. Outros quatro satDNAs apresentaram abundância superior a 1% (BombusSat02-861, BombusSat03-5883, BombusSat04-169, BombusSat05-203). Já os satDNAs menos abundantes foram BombusSat90-82 e BombusSat92-145, que apresentaram apenas 0,0001% de abundância. Das 91 famílias de satDNAs, somente 20 possuem abundância igual ou superior a 0,1%. Os satDNAs com maior e menor divergência foram BombusSat71-172 e BombusSat08-209, com 30,89% e 2,39%, respectivamente. Apenas duas famílias são exclusivas do genoma de *B. turneri*, BturSat01-255 e BturSat02-156, que apresentaram valores de abundância de 0,1510% e 0,0154%, de divergência de 16,95% e 16,49%, conteúdo AT de 44,7% e 58,3% respectivamente. Entre os oito satDNAs não compartilhados pelas espécies, os dois exclusivos

de *B. turneri*, BturSat01-255 e BturSat02-156, foram os que apresentaram menor conteúdo AT (Tabela 2).

Na espécie *B. bohemicus* o genoma analisado é composto de 13,3749% de satDNA, totalizando 87 famílias. Nessa espécie, a abundância dos satDNAs variou de 0,0001% a 5,9513%, em BombusSat73-149 e BombusSat19-30, respectivamente. Além do satDNA BombusSat19-30, apenas o satDNA BombusSat07-142 possui abundância superior a 1%. Em *B. bohemicus*, 66 satDNAs possuem abundância inferior a 0,1%. O satDNA BombusSat71-172 apresentou a maior divergência de 33,79%, enquanto que o satDNA exclusivo desta espécie, BbohSat01-160, é menos divergente (1,95%), com abundância de 0,0248% e 61,9% de conteúdo AT.

Dentre as espécies, *B. skorikovi* foi a que apresentou maior proporção de satDNA no genoma, 24,1020% distribuído em 88 famílias. Apesar de possuir muitas famílias de satDNA, mais de metade (55,11%) é de um único satDNA (BombusSat19-30). Além disso, 73 famílias possuem abundância inferior a 0,1%, sendo o menos abundante BombusSat73-149, com 0,0001%. A divergência variou de 3,02% em BombusSat62-61, a 38,69% em BombusSat41-169. Nesta espécie, o único satDNA exclusivo foi BskoSat01-419, que apresentou abundância de 0,0259%, divergência de 3,99%. Além disso, esse satDNA possui o maior conteúdo de AT observado entre os satDNA analisados, 92,1%.

Em *B. ardens*, o genoma analisado é composto de 18,9301% de satDNA. Essa espécie foi a que apresentou maior número de famílias, 92 no total, sendo duas exclusivas dessa espécie (BardSat01-131 e BardSat02-167). Nessa espécie, 9,2761% do genoma (49,01% do satDNA) é composto exclusivamente pelo satDNA BombusSat19-30, enquanto o satDNA o BombusSat92-145 tem abundância de apenas 0,0001%. A maioria dos satDNAs, cerca de 73,91%, apresenta abundância inferior a 0,1%. O satDNA mais divergente foi BombusSat51-146 (31,89%) e o menos divergente com BombusSat68-784 (2,73%). Os dois satDNA não compartilhados, BardSat01-131 e BardSat02-167, apresentaram abundância de 0,1958% e 0,0969%, divergência de 5,49% e 6%, e conteúdo AT de 82,6 e 88,6%, respectivamente.

Na espécie *B. v. nearcticus*, o satDNA representou 14,2377% do genoma, distribuído em 80 famílias. A família BombusSat19-30 é a mais representada, constituindo 6,4772% do genoma. Por outro lado, o satDNA BombusSat92-145 possui abundância de apenas 0,0001%. A divergência variou entre 2,16% e 31,65% em BombusSat53-727 e BombusSat69-152, respectivamente. São 65 famílias com representação inferior a 0,1%. Apenas o satDNA BvanSat01-803 não é compartilhado com nenhuma espécie. Esse possui abundância de 0,0877%, divergência de 8,21% e 86,9% de AT.

O genoma de *B. vosnesenskii* é composto de 16,4092% de satDNA, distribuído a 85 famílias. O satDNA BombusSat19-30 é o mais abundante (3,4452%) e o BombusSat73-149 é menos abundante, com 0,0001%. Os satDNAs BombusSat37-6206, BombusSat77-152, BombusSat27-7130, BombusSat09-1070 também apresentaram valores de abundância superiores a 1%. Nesta espécie a divergência dos satDNA variou entre 0,64% (BvosSta01-390) a 34,28% (BombusSat41-169). Foram encontradas 67 famílias com abundância menor que 0,1%. O satDNA exclusivo dessas espécies, BvosSat01-390, apresentou abundância de 0,0968%, divergência de 0,64% e conteúdo AT de 86,7%.

Na biblioteca de *Bombus*, o satDNA BombusSat19-30, está presente em todas as espécies como o mais abundante, exceto em *B. turneri*, em que sua abundância é de apenas 0,1033%. Nas demais outras cinco espécies a abundância do satDNA BombusSat19-30 variou de 3,4452% em *B. vosnesenskii* a 13,2843% em *B. skorikovi*. Em *B. turneri* o satDNA BombusSat01-4996 é o mais abundante (1,5405%), além disso, outros quatro satDNAs têm valores de abundância similares a este (Tabela 2).

Tabela 2 - Características das famílias de satDNA identificadas nos genomas de seis espécies de *Bombus*: *B. turneri*, *B. bohemicus*, *B. skorikovi*, pertencentes ao subgênero *Psithyrus* e *B. ardens*, *B. v. nearcticus* e *B. vosnesenskii*. CM: Comprimento do monômero. AT (%): Conteúdo de bases AT. Destacado em cinza o satDNA mais abundante de cada espécie.

| Família de DNA satélite | CM | A + T (%) | Abundância (%) | | | | | | Divergência (%) | | | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | Subgênero <i>Psithyrus</i> | | | Subgênero <i>Pyrobombus</i> | | | Subgênero <i>Psithyrus</i> | | | Subgênero <i>Pyrobombus</i> | | |
| | | | <i>B. turneri</i> | <i>B. bohemicus</i> | <i>B. skorikovi</i> | <i>B. ardens</i> | <i>B. v. nearcticus</i> | <i>B. vosnesenskii</i> | <i>B. turneri</i> | <i>B. bohemicus</i> | <i>B. skorikovi</i> | <i>B. ardens</i> | <i>B. v. nearcticus</i> | <i>B. vosnesenskii</i> |
| BombusSat01-4996 | 4996 | 35,3 | 1,5405 | 0,3936 | 0,661 | 0,1957 | 0,2313 | 0,4904 | 10,11 | 24,01 | 24,03 | 23,59 | 23,92 | 24,59 |
| BombusSat02-861 | 861 | 53,2 | 1,3577 | 0,022 | 0,0331 | 0,0251 | 0,0191 | 0,0141 | 5,34 | 5,36 | 4,74 | 9,01 | 7,45 | 6,93 |
| BombusSat03-5883 | 5883 | 61,2 | 1,2953 | 0,614 | 0,2893 | 0,1153 | 0,07 | 0,0907 | 8,68 | 17,32 | 19,67 | 23,79 | 25,96 | 24,42 |
| BombusSat04-169 | 169 | 56,8 | 1,2736 | 0,5455 | 0,3511 | 2,4067 | 0,007 | 0,0173 | 16,74 | 27,68 | 26,57 | 27,08 | 26,22 | 26,57 |
| BombusSat05-203 | 203 | 47,8 | 1,2205 | - | - | - | 0,0001 | 0,0002 | 13,19 | - | - | - | 17,98 | 16,98 |
| BombusSat06-2408 | 2408 | 54,8 | 0,5923 | 0,2328 | 0,0879 | 0,3324 | 0,0137 | 0,0285 | 8,59 | 12,6 | 17 | 23,93 | 19,34 | 19,68 |
| BombusSat07-142 | 142 | 55,6 | 0,4846 | 1,2776 | 3,29 | 0,0086 | 0,0003 | 0,0005 | 21,45 | 15,25 | 6,33 | 19,47 | 19,03 | 22,36 |
| BombusSat08-209 | 209 | 62,2 | 0,3544 | 0,1173 | 0,2071 | 0,0003 | - | 0,0001 | 2,39 | 8,7 | 8,17 | 21,7 | - | 20,59 |
| BombusSat09-1070 | 1070 | 56,7 | 0,2431 | 0,5185 | 0,3685 | 0,7184 | 0,5888 | 1,1387 | 21,35 | 23,6 | 23,24 | 17,39 | 23,6 | 17,38 |
| BombusSat10-2422 | 2422 | 55,6 | 0,2119 | 0,1202 | 0,1765 | 0,1396 | 0,0752 | 0,0587 | 6,89 | 7,39 | 6,87 | 8,66 | 7,48 | 7,04 |
| BombusSat11-4920 | 4920 | 59 | 0,2083 | 0,045 | 0,1972 | 0,0428 | 0,0554 | 0,081 | 2,46 | 26 | 10,06 | 23,67 | 26,07 | 25,12 |
| BombusSat12-1187 | 1187 | 46,9 | 0,1747 | 0,04 | 0,0633 | 0,0474 | 0,0972 | 0,0932 | 15,69 | 15,68 | 14,94 | 15,36 | 12,46 | 13,45 |
| BombusSat13-6983 | 6983 | 60,3 | 0,1707 | 0,1724 | 0,1959 | 0,2795 | 0,1987 | 0,3608 | 19,08 | 26,04 | 23,72 | 17,26 | 17,46 | 17,27 |
| BombusSat14-897 | 897 | 60 | 0,1423 | 0,4526 | 0,2289 | 0,2907 | 0,3582 | 0,5763 | 19,71 | 21,01 | 19,96 | 20,49 | 20,89 | 20,85 |
| BombusSat15-796 | 796 | 53,5 | 0,1184 | 0,4326 | 0,1907 | 0,0306 | 0,042 | 0,0692 | 15,55 | 9,59 | 16,89 | 24,84 | 21,37 | 20,42 |
| BombusSat16-4281 | 4281 | 50,2 | 0,1184 | 0,3405 | 0,0488 | 0,1364 | 0,1373 | 0,38 | 18,64 | 3,36 | 15,52 | 28,6 | 26,5 | 26,23 |
| BombusSat17-5872 | 5872 | 46,2 | 0,1173 | 0,0686 | 0,0403 | 0,1661 | 0,1718 | 0,1159 | 20,95 | 20,87 | 22,08 | 20,28 | 4,95 | 13,8 |
| BombusSat18-2958 | 2958 | 59,6 | 0,1084 | 0,2712 | 0,1489 | 0,2592 | 0,0805 | 0,3071 | 12,14 | 12,21 | 12,43 | 10,23 | 10,82 | 10,07 |
| BombusSat19-30 | 30 | 73,3 | 0,1033 | 5,9513 | 13,2843 | 9,2761 | 6,4772 | 3,4452 | 14,55 | 13,34 | 12,18 | 18,9 | 19,95 | 21,12 |
| BombusSat20-1993 | 1993 | 58 | 0,0978 | 0,1487 | 0,0588 | 0,4449 | 0,0035 | 0,0105 | 23,65 | 21,36 | 21,42 | 27,38 | 26,39 | 27,98 |
| BombusSat21-60 | 60 | 76,7 | 0,0927 | 0,3817 | 3,0983 | 0,4632 | 0,0725 | 0,0654 | 14,27 | 14,07 | 13,92 | 20,14 | 23,33 | 23,06 |
| BombusSat22-142 | 142 | 62,7 | 0,064 | 0,0003 | 0,0008 | 0,0006 | - | 0,0002 | 16,25 | 26,51 | - | 21,34 | 23,53 | 24,61 |
| BombusSat23-152 | 152 | 55,9 | 0,0555 | 0,116 | 0,0018 | 0,0079 | 0,004 | 0,0043 | 18,8 | 7,44 | 18,57 | 23,7 | 23,46 | 26,29 |
| BombusSat24-173 | 173 | 61,3 | 0,0421 | 0,0011 | 0,0022 | 0,0128 | 0,0001 | 0,0001 | 20,32 | 31,79 | 31,11 | 29,19 | 24,59 | 26,22 |
| BombusSat25-192 | 192 | 59,9 | 0,0406 | 0,0196 | 0,0123 | 0,043 | 0,044 | 0,0392 | 19,58 | 24,38 | 22,88 | 17,46 | 15,29 | 16,01 |
| BombusSat26-151 | 151 | 52,3 | 0,0389 | 0,0026 | 0,0018 | 0,4062 | 0,0033 | 0,0173 | 21,83 | 15,99 | 21 | 20,47 | 20,18 | 23,2 |
| BombusSat27-7130 | 7130 | 60,4 | 0,0387 | 0,1011 | 0,0459 | 0,1745 | 0,4838 | 1,8711 | 22,54 | 24,13 | 22,54 | 22,88 | 11,69 | 6,6 |
| BombusSat28-5721 | 5721 | 47,5 | 0,0384 | 0,0332 | 0,0194 | 0,0297 | 0,0097 | 0,01 | 22,18 | 24,1 | 23,66 | 23,53 | 23,65 | 21,33 |
| BombusSat29-412 | 412 | 69,2 | 0,0377 | 0,0898 | 0,0841 | 0,146 | 0,0783 | 0,1169 | 17,08 | 18,04 | 18,84 | 16,47 | 14,85 | 15,12 |
| BombusSat30-30 | 30 | 36,9 | 0,0346 | 0,0039 | 0,0099 | 0,004 | 0,0132 | 0,0191 | 19,08 | 14,55 | 15,52 | 17,46 | 16,46 | 17,38 |
| BombusSat31-13864 | 13864 | 63,6 | 0,0343 | 0,0874 | 0,0603 | 0,0933 | 0,3793 | 0,7421 | 29,64 | 29,18 | 27,65 | 30,66 | 7,55 | 4,24 |
| BombusSat32-331 | 331 | 63,7 | 0,0319 | 0,0185 | 0,02 | 0,0008 | 0,0001 | 0,0001 | 19,65 | 21,72 | 20,92 | 21,63 | 15,35 | 18,45 |
| BombusSat33-2749 | 2749 | 50,8 | 0,0313 | 0,0215 | 0,037 | 0,1821 | 0,4031 | 0,367 | 20,78 | 21,14 | 22,87 | 18,57 | 9,39 | 10,54 |
| BombusSat34-832 | 832 | 63 | 0,0291 | 0,0023 | 0,0023 | 0,0014 | 0,0023 | 0,0015 | 5,27 | 19,1 | 19,15 | 18,45 | 18,38 | 18,65 |
| BombusSat35-169 | 169 | 59,2 | 0,0284 | 0,0042 | 0,0086 | 0,0581 | 0,0006 | 0,0008 | 27,08 | 33,78 | 29,33 | 29,72 | 23,48 | 24,61 |
| BombusSat36-152 | 152 | 55,3 | 0,0271 | 0,0016 | 0,0025 | 0,0669 | 0,0078 | 0,0106 | 20,95 | 25,42 | 21,74 | 25,07 | 24,03 | 25,58 |
| BombusSat37-6206 | 6206 | 62,1 | 0,0263 | 0,14 | 0,0655 | 0,0818 | 0,1014 | 2,2118 | 20,87 | 13,23 | 17,45 | 21,81 | 11,54 | 1,31 |
| BombusSat38-4778 | 4778 | 63,1 | 0,0253 | 0,1232 | 0,0592 | 0,1016 | 0,891 | 0,1804 | 20,33 | 15,83 | 19,06 | 21,3 | 2,99 | 16,01 |
| BombusSat39-525 | 525 | 47,8 | 0,0206 | 0,0027 | 0,0038 | 0,0385 | 0,0022 | 0,0048 | 22,73 | 27,27 | 25 | 24,27 | 24,82 | 26,91 |
| BombusSat40-710 | 710 | 54,8 | 0,0188 | 0,0097 | 0,0159 | 0,0093 | 0,005 | 0,0045 | 18,2 | 17,84 | 17,64 | 18,86 | 17,69 | 17,7 |
| BombusSat41-169 | 169 | 56,2 | 0,0183 | 0,0001 | 0,0009 | 0,0078 | - | 0,0002 | 16,43 | 32,66 | 38,69 | 31,25 | - | 34,28 |
| BombusSat42-373 | 373 | 67,8 | 0,0181 | 0,0003 | 0,0022 | 0,0012 | - | 0,0001 | 15,73 | 11,25 | 19,58 | 23,08 | - | 21,48 |
| BombusSat43-147 | 147 | 62,6 | 0,0155 | 0,0002 | 0,0001 | 0,0026 | 0,0009 | 0,0011 | 9,95 | 26,41 | 25,08 | 29,3 | 29,16 | 29,35 |
| BombusSat44-4429 | 4429 | 63,2 | 0,0148 | 0,0382 | 0,0231 | 0,0721 | 0,0207 | 0,0408 | 17,05 | 19,04 | 18,97 | 14,67 | 18,66 | 21,16 |
| BombusSat45-172 | 172 | 61,6 | 0,0136 | 0,0015 | 0,0026 | 0,0154 | 0,0003 | 0,0005 | 27,58 | 27,78 | 33,56 | 28,75 | 21,58 | 23,43 |
| BombusSat46-723 | 723 | 56,3 | 0,012 | 0,0085 | 0,0118 | 0,0066 | 0,0042 | 0,0039 | 19,41 | 19,42 | 19,14 | 21,18 | 19,92 | 20,12 |
| BombusSat47-383 | 383 | 59,8 | 0,0116 | 0,0027 | 0,0035 | 0,1363 | 0,0527 | 0,1196 | 20 | 18,14 | 18,57 | 15,24 | 5,71 | 1,19 |
| BombusSat48-2964 | 2964 | 73,6 | 0,0116 | 0,0187 | 0,0239 | 0,0446 | 0,0431 | 0,0413 | 27,01 | 27,9 | 27,18 | 26,26 | 26,63 | 26,6 |
| BombusSat49-152 | 152 | 54,6 | 0,0113 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0049 | 0,0011 | 0,0016 | 24,34 | 29,39 | 24,97 | 29,64 | 24,32 | 26,79 |
| BombusSat50-752 | 752 | 51,1 | 0,009 | 0,0001 | 0,005 | 0,0151 | 0,3129 | 0,9383 | 12,91 | 18,62 | 12,71 | 16,5 | 7,82 | 1,86 |
| BombusSat51-146 | 146 | 50,0 | 0,0089 | 0,0012 | 0,0036 | 0,0009 | 0,0006 | 0,0007 | 10,91 | 18,56 | 21,38 | 31,89 | 27,48 | 28,39 |
| BombusSat52-4031 | 4031 | 67,1 | 0,0074 | 0,022 | 0,0187 | 0,0216 | 0,0198 | 0,0155 | 19,74 | 19,87 | 20,02 | 14,82 | 15,32 | 15,8 |
| BombusSat53-727 | 727 | 50,5 | 0,0073 | 0,0066 | 0,0022 | 0,0722 | 1,3941 | 0,1352 | 16,61 | 12,53 | 13,79 | 16,04 | 2,16 | 5,18 |
| BombusSat54-422 | 422 | 57,1 | 0,0072 | 0,0005 | 0,0012 | 0,0006 | 0,0004 | 0,0003 | 24,81 | 16,78 | 8,66 | 18,65 | 19,55 | 20,17 |

Tabela 02 - continuação.

| Familia de DNA satélite | CM | A + T (%) | Abundância (%) | | | | | | Divergência (%) | | | | | |
|----------------------------|------|--------------|----------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | Subgênero <i>Psithyrus</i> | | | Subgênero <i>Pyrobombus</i> | | | Subgênero <i>Psithyrus</i> | | | Subgênero <i>Pyrobombus</i> | | |
| | | | <i>B. turneri</i> | <i>B. bohemicus</i> | <i>B. skorikovii</i> | <i>B. ardens</i> | <i>B. v. nearcticus</i> | <i>B. vosnesenskii</i> | <i>B. turneri</i> | <i>B. bohemicus</i> | <i>B. skorikovii</i> | <i>B. ardens</i> | <i>B. v. nearcticus</i> | <i>B. vosnesenskii</i> |
| BombusSat55-153 | 153 | 58,2 | 0,0058 | 0,0001 | 0,0004 | 0,003 | 0,0002 | 0,0006 | 24,25 | 28,69 | 27,87 | 28,31 | 23,75 | 29,01 |
| BombusSat56-173 | 173 | 58,4 | 0,0055 | 0,0011 | 0,0002 | 0,0034 | - | - | 10,64 | 21,29 | 12,74 | 27,02 | - | - |
| BombusSat57-207 | 207 | 66,7 | 0,0048 | 0,0028 | 0,0017 | 0,0001 | - | - | 19,88 | 18,04 | 17,87 | 22,56 | - | - |
| BombusSat58-152 | 152 | 61,8 | 0,0044 | 0,0003 | 0,0008 | 0,0115 | 0,001 | 0,0023 | 25,03 | 30,31 | 31,06 | 22,6 | 25,33 | 25,62 |
| BombusSat59-172 | 172 | 57,6 | 0,004 | 0,0006 | 0,0003 | 0,9686 | 0,0014 | 0,0015 | 29,16 | 28,54 | 39,51 | 11,27 | 17,8 | 17,1 |
| BombusSat60-331 | 331 | 61,0 | 0,0036 | 0,0052 | 0,0044 | 0,0122 | 0,018 | 0,0415 | 15,84 | 16,18 | 14,52 | 16,64 | 16,49 | 17,37 |
| BombusSat61-152 | 152 | 61,2 | 0,0034 | 0,0003 | 0,0004 | 0,0013 | 0,0001 | 0,0001 | 27,82 | 28,69 | 28,78 | 30,16 | 27,55 | 29,34 |
| BombusSat62-61 | 61 | 75,4 | - | - | 0,0089 | 0,0027 | - | - | - | - | 3,02 | 20,91 | - | - |
| BombusSat63-210 | 210 | 63,3 | 0,0025 | 0,0013 | 0,0008 | 0,0001 | - | - | 16,46 | 19,45 | 20,43 | 20,23 | - | - |
| BombusSat64-206 | 206 | 83,0 | 0,0024 | 0,0002 | 0,0016 | 0,009 | 0,0003 | 0,001 | 31,29 | 33,98 | 27,80 | 28,40 | 32,44 | 33,98 |
| BombusSat65-151 | 151 | 56,3 | 0,0024 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0031 | 0,0002 | 0,0007 | 26,67 | 26,09 | 24,18 | 17,99 | 29,62 | 30,1 |
| BombusSat66-147 | 147 | 58,5 | 0,0024 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0021 | 0,0001 | 0,0009 | 27,36 | 27,48 | 24,51 | 24,69 | 22,56 | 27,93 |
| BombusSat67-152 | 152 | 59,2 | 0,0022 | 0,0001 | 0,0014 | 0,0234 | 0,0011 | 0,0015 | 26,89 | 27,51 | 25,02 | 20,99 | 25,01 | 26,11 |
| BombusSat68-784 | 784 | 62,1 | 0,0021 | 0,0378 | 0,0064 | 0,0131 | 0,0031 | 0,0009 | 12,38 | 12,26 | 11,05 | 2,73 | 8 | 6,97 |
| BombusSat69-152 | 152 | 57,2 | 0,0018 | 0,0005 | 0,0003 | 0,0008 | 0,0002 | 0,0001 | 24,74 | 20,62 | 26,93 | 33,18 | 31,65 | 29,77 |
| BombusSat70-153 | 153 | 62,7 | 0,0016 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0015 | 0,0006 | 0,002 | 27,74 | 26,01 | 22,37 | 27,59 | 21,36 | 23,26 |
| BombusSat71-172 | 172 | 57,6 | 0,0015 | 0,0001 | 0,0011 | 0,0605 | 0,0055 | 0,008 | 30,89 | 33,79 | 27,4 | 17,55 | 5,09 | 8,61 |
| BombusSat72-12 | 12 | 58,3 | 0,0015 | 0,2632 | 0,0019 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | 14,66 | 2,88 | 9,81 | 24,25 | 27,14 | 28,03 |
| BombusSat73-149 | 149 | 59,7 | 0,0015 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0004 | - | 0,0001 | 23,72 | 29,24 | 29,44 | 29,05 | - | 32,32 |
| BombusSat74-152 | 152 | 60,5 | 0,0012 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0002 | 27,09 | 27,33 | 24,42 | 24,39 | 21,55 | 30,18 |
| BombusSat75-271 | 271 | 59,0 | 0,0012 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0031 | 0,0001 | 0,0024 | 28,29 | 27,06 | 26,49 | 25,41 | 25,76 | 33,25 |
| BombusSat76-300 | 300 | 55,0 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0012 | 0,0001 | 0,0001 | 21,5 | 27,26 | 25,02 | 23,66 | 25,4 | 28,99 |
| BombusSat77-152 | 152 | 58,8 | 0,0011 | 0,0005 | 0,0015 | 0,1019 | 1,0678 | 1,957 | 22,75 | 19,93 | 21,21 | 22,74 | 7,88 | 9,92 |
| BombusSat78-104 | 104 | 69,2 | 0,001 | 0,0023 | 0,0014 | 0,0014 | 0,0016 | 0,0013 | 23,82 | 23,77 | 24,6 | 25,46 | 25,24 | 24,99 |
| BombusSat79-172 | 172 | 60,5 | 0,001 | - | - | 0,0015 | - | - | 27,25 | - | - | 26,51 | - | - |
| BombusSat80-2362 | 2362 | 70,6 | 0,0008 | 0,0008 | 0,0001 | 0,0046 | 0,0022 | 0,013 | 22,18 | 21,52 | 20,52 | 24,66 | 28,56 | 25,05 |
| BombusSat81-152 | 152 | 59,9 | 0,0007 | 0,0006 | 0,0002 | 0,0011 | 0,0001 | 0,0002 | 16,31 | 22,12 | 21,8 | 27,31 | 17,62 | 30,99 |
| BombusSat82-649 | 649 | 66,3 | 0,0007 | 0,0037 | 0,0007 | 0,1469 | 0,0202 | 0,0263 | 17,11 | 21,52 | 18,99 | 3,57 | 6,22 | 14,98 |
| BombusSat83-617 | 617 | 69,7 | 0,0006 | 0,001 | 0,0018 | 0,0024 | 0,0017 | 0,002 | 28,13 | 29,07 | 29,07 | 26,93 | 26,61 | 27,11 |
| BombusSat84-140 | 140 | 55,0 | 0,0004 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0014 | 0,0001 | 0,0001 | 24,97 | 29,94 | 29,17 | 24,54 | 25,32 | 28,73 |
| BombusSat85-170 | 170 | 60,0 | - | 0,0001 | 0,0001 | 0,0004 | 0,0188 | 0,0019 | - | 16,96 | 22,13 | 22,27 | 8,08 | 9,76 |
| BombusSat86-351 | 351 | 66,4 | 0,0003 | 0,0006 | 0,0004 | 0,0117 | 0,0011 | 0,0006 | 24,64 | 25,85 | 26,13 | 8,7 | 20,94 | 21,91 |
| BombusSat87-255 | 255 | 62,7 | 0,0003 | 0,0001 | 0,0002 | 0,0011 | - | - | 20,36 | 23,12 | 21,21 | 22,66 | - | - |
| BombusSat88-51 | 51 | 47,1 | 0,0003 | 0,0001 | 0,464 | - | - | - | 29,12 | 29,13 | 4,99 | - | - | - |
| BombusSat89-156 | 156 | 59,0 | 0,0002 | - | - | 0,0004 | 0,0001 | 0,0001 | 30,2 | - | - | 25,84 | 26,27 | 26,29 |
| BombusSat90-82 | 82 | 64,6 | 0,0001 | 0,0004 | 0,0003 | 0,0005 | 0,0003 | 0,0008 | 25,18 | 25,64 | 25,99 | 27,3 | 26,83 | 25,86 |
| BombusSat91-81 | 81 | 81,5 | - | - | - | 0,0001 | 0,0246 | 0,0004 | - | - | - | 6,69 | 4,26 | 3,98 |
| BombusSat92-145 | 145 | 69,0 | 0,0001 | - | - | 0,0001 | - | - | 18,52 | - | - | 19,73 | - | - |
| BturSat01-255 | 255 | 44,7 | 0,151 | - | - | - | - | - | 16,95 | - | - | - | - | - |
| BturSat02-156 | 156 | 58,3 | 0,0154 | - | - | - | - | - | 16,49 | - | - | - | - | - |
| BskoSat01-419 | 419 | 92,1 | - | - | 0,0259 | - | - | - | - | - | 3,99 | - | - | - |
| BardSat01-131 | 131 | 82,6 | - | - | - | 0,1958 | - | - | - | - | - | 5,49 | - | - |
| BardSat02-167 | 167 | 88,6 | - | - | - | 0,0969 | - | - | - | - | - | 6 | - | - |
| BvosSat01-390 | 390 | 86,7 | - | - | - | - | - | 0,0968 | - | - | - | - | - | 0,64 |
| BvanSat01-803 | 803 | 86,9 | - | - | - | - | 0,0877 | - | - | - | - | - | 8,21 | - |
| BbohSat01-160 | 160 | 61,9 | - | 0,0248 | - | - | - | - | - | 1,95 | - | - | - | - |
| Total | | | 11,0878% | 13,3749% | 24,1020% | 18,9301% | 14,2377% | 16,4092% | | | | | | |

A análise da landscape (abundância versus divergência) do satDNA BombusSat19-30 mais abundante na maioria das espécies, mostrou um pico de abundância entre 10 e 15% de divergência para as espécies do subgênero *Psithyrus* e aproximadamente 20% para as espécies de Subgênero *Pyrobombus*, que indica ausência de ampliações recentes (Figura 1A-C e 2A-

C). O satDNA BombusSat01-4996, mais abundante em *B. turneri*, apresentou pico de abundância em divergência por volta 2% (Figura 1A).

Em *B. turneri*, a análise do gráfico sugere que dos outros quatro satDNAs mais abundantes, a amplificação mais recente foi do satDNA BombusSat02-86, que apresentou pico de abundância em divergência inferior a 5% (Figura 1A). Além disso, os satDNA BombusSat08-209 e BombusSat11-4920, com abundância de 0,3544% e 0,2083%, respectivamente, apresentaram pico de abundância em divergência inferior a 3%, indicando que esses satDNA podem ser os de amplificação mais recente nessa espécie (Figura 1A).

Em *B. bohemicus*, o BombusSat07-142 apresentou abundância superior a 1%, contudo, o pico de abundância foi em divergência principalmente entre 10 e 20%, sugere que a amplificação não tenha sido recente. Ademais, os satDNA BombusSat16-4281 e BombusSat72-12, apresentam pico de abundância em divergência inferior a 5%, o que indica que esses satDNA foram amplificados recentemente nessa apenas nessas espécies, uma vez que nas demais espécies os mesmos apresentam valores de divergência superiores 14% (Figura 1B/Tabela 02).

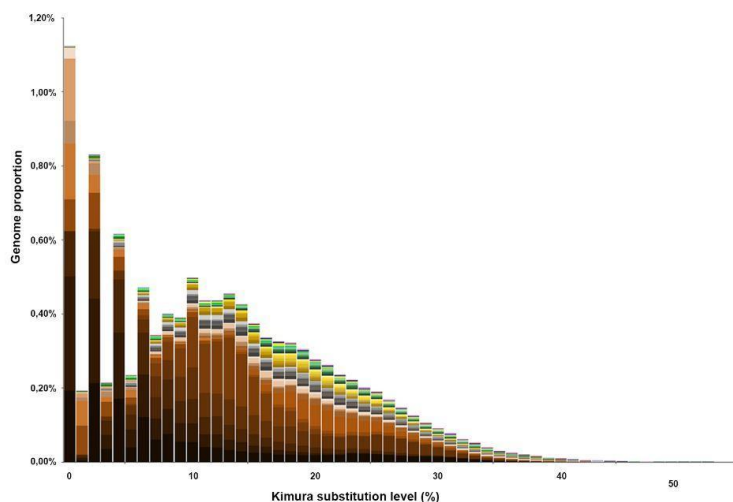
Em *B. skorikovi*, os satDNAs BombusSat07-142 e BombusSat21-60, também apresentaram abundância superior a 1%, entretanto, enquanto o primeiro apresentou pico de abundância em baixa divergência (inferior a 5%), e segundo uma curva de distribuição mais achatada, com as maiores abundâncias distribuída em divergência entre 10 e 15% (Figura 1C). Esses dados sugerem que o satDNA BombusSat07-142 possa ter sido amplificado recentemente nessa espécie, explicando assim a maior abundância e menor divergência, quando comparado às demais espécies (Tabela 2).

Em *B. ardens* o satDNA BombusSat04-169, o segundo mais abundante (2,4067%), apresentou um achatamento na curva de distribuição com abundância predominantemente entre 20 e 30% (Figura 2B). No entanto, os satDNAs com abundância baixa, BombusSat68-784, BombusSat82-649, BardSat01-131 e BardSat02-167, parecem ter passado por ciclos de amplificação recente, considerando a maior abundância desses satDNA são em divergência inferior a 5% nessa espécie (Figura 2A).

Em *B. v. nearticus* os satDNAs BombusSat53-727 e BombusSat77-152, também apresentaram abundância superior a 1%. A análise sugere que apesar de estar presente em todas as espécies, esses satDNA tiveram uma amplificação mais recente em *B. v. nearticus*, pois

apresentaram pico de abundância com divergência inferior 5% (Figura 2A). Os satDNAs, BombusSat17-5872, BombusSat27-7130, BombusSat31-13864 e BombusSat38-4778, com abundância inferior a 1% (Tabela 01), parecem também parecem ter passado por ciclo de amplificação mais recente nessa espécie, pois apresentaram pico de abundância em valores de divergência inferior a 5% (Figura 2B).

Em *B. vosnesenskii*, análise do gráfico de abundância *versus* divergência, mostrou que os satDNAs BombusSat27-7130, BombusSat31-13864, BombusSat37-6206 e BombusSat50-752 apresentaram pico de abundância com divergência de até 3%, sugerindo amplificação recente nessa espécie (Figura 2C).

(A) *Bombus turneri*

Famílias de DNA satélite

- BombusSat01-4996
- BombusSat02-861
- BombusSat03-5883
- BombusSat04-169
- BombusSat05-203
- BombusSat06-2408
- BombusSat07-142
- BombusSat08-209
- BombusSat09-1070
- BombusSat10-2422
- BombusSat11-4920
- BombusSat12-1187
- BombusSat13-6983
- BombusSat14-897
- BombusSat15-796
- BombusSat16-4281
- BombusSat17-5872
- BombusSat18-2958
- BombusSat19-30
- BombusSat20-1993
- BombusSat21-60
- BombusSat22-142
- BombusSat23-152
- BombusSat24-173
- BombusSat25-192
- BombusSat26-151
- BombusSat27-7130
- BombusSat28-5721
- BombusSat29-412
- BombusSat30-30
- BombusSat31-13864
- BombusSat32-331
- BombusSat33-2749
- BombusSat34-832
- BombusSat35-169
- BombusSat36-152
- BombusSat37-6206
- BombusSat38-4778
- BombusSat39-525
- BombusSat40-710
- BombusSat41-169
- BombusSat42-373
- BombusSat43-147
- BombusSat44-4429
- BombusSat45-172
- BombusSat46-723
- BombusSat47-383
- BombusSat48-2964
- BombusSat49-152
- BombusSat50-752
- BombusSat51-146
- BombusSat52-4031
- BombusSat53-727
- BombusSat54-422
- BombusSat55-153
- BombusSat56-173
- BombusSat57-207
- BombusSat58-152
- BombusSat59-152
- BombusSat60-331
- BombusSat61-152
- BombusSat62-61
- BombusSat63-210
- BombusSat64-206
- BombusSat65-151
- BombusSat66-147
- BombusSat67-152
- BombusSat68-784
- BombusSat69-152
- BombusSat70-153
- BombusSat71-172
- BombusSat72-12
- BombusSat73-149
- BombusSat74-152
- BombusSat75-271
- BombusSat76-300
- BombusSat77-152
- BombusSat78-104
- BombusSat79-172
- BombusSat80-2362
- BombusSat81-152
- BombusSat82-649
- BombusSat83-617
- BombusSat84-140
- BombusSat85-170
- BombusSat86-351
- BombusSat87-255
- BombusSat88-51
- BombusSat89-156
- BombusSat90-82
- BombusSat92-145
- BturSat01-255
- BturSat02-156
- BbohSat01-160
- BskoSat01-419

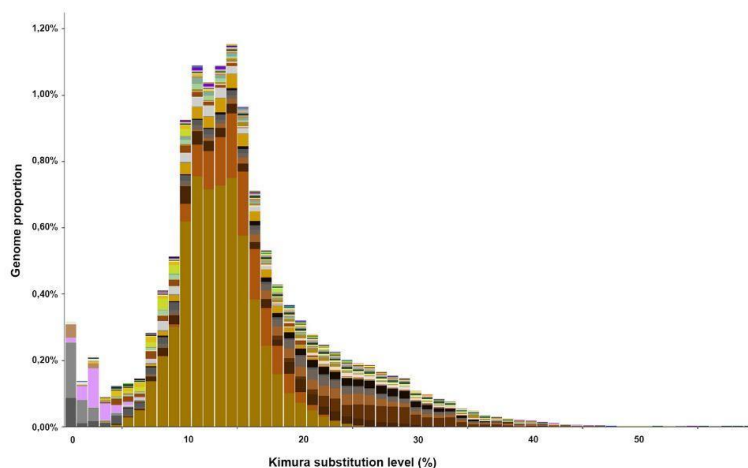
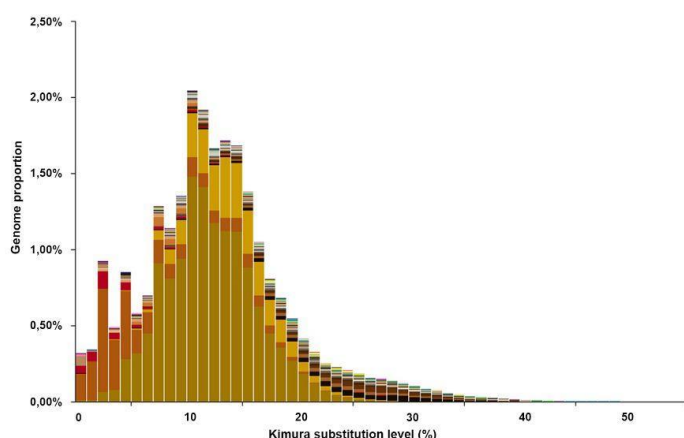
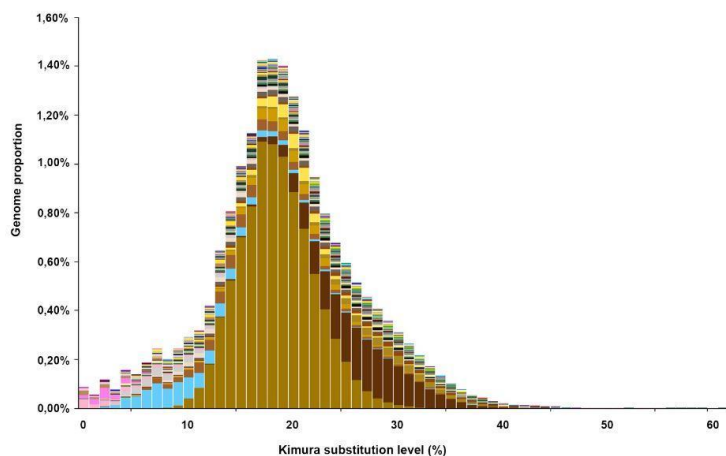
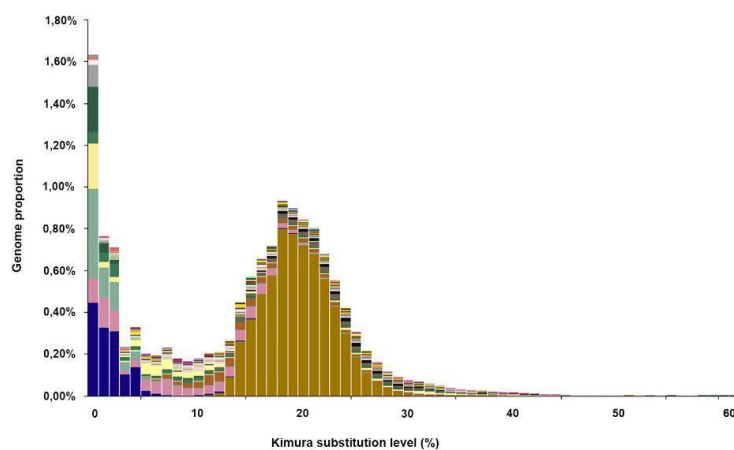
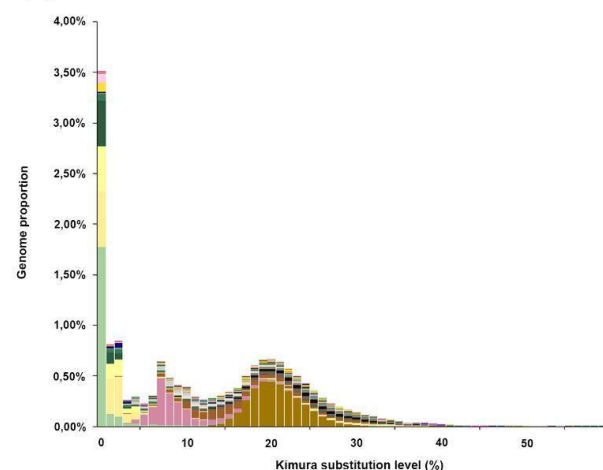
(B) *Bombus bohemicus*(C) *Bombus skorikovi*

Figura 1 - Landscape (abundância versus divergência) para as famílias de satDNAs identificados nos genomas das espécies do subgênero *Psithyrus*. Note a predominância da família BombusSat19-30 em *B. bohemicus* e *B. skorikovi* enquanto as famílias BombusSat01-4996, BombusSat02-861, BombusSat03-5883, BombusSat04-169 e BombusSat05-203 são as mais abundantes no genoma de *B. turneri* com valores similares de abundância.

(A) *Bombus ardens*(B) *Bombus vancouverensis nearcticus*(C) *Bombus vosnesenskii*

Famílias de DNA satélite

- BombusSat01-4996
- BombusSat02-861
- BombusSat03-5883
- BombusSat04-169
- BombusSat05-203
- BombusSat06-2408
- BombusSat07-142
- BombusSat08-209
- BombusSat09-1070
- BombusSat10-2422
- BombusSat11-4920
- BombusSat12-1187
- BombusSat13-6983
- BombusSat14-897
- BombusSat15-796
- BombusSat16-4281
- BombusSat17-5872
- BombusSat18-2958
- BombusSat19-30
- BombusSat20-1993
- BombusSat21-60
- BombusSat22-142
- BombusSat23-152
- BombusSat24-173
- BombusSat25-192
- BombusSat26-151
- BombusSat27-7130
- BombusSat28-5721
- BombusSat29-412
- BombusSat30-30
- BombusSat31-13864
- BombusSat32-331
- BombusSat33-2749
- BombusSat34-832
- BombusSat35-169
- BombusSat36-152
- BombusSat37-6206
- BombusSat38-4778
- BombusSat39-525
- BombusSat40-710
- BombusSat41-169
- BombusSat42-373
- BombusSat43-147
- BombusSat44-4429
- BombusSat45-172
- BombusSat46-723
- BombusSat47-383
- BombusSat48-2964
- BombusSat49-152
- BombusSat50-752
- BombusSat51-146
- BombusSat52-4031
- BombusSat53-727
- BombusSat54-422
- BombusSat55-153
- BombusSat56-173
- BombusSat57-207
- BombusSat58-152
- BombusSat59-152
- BombusSat60-331
- BombusSat61-152
- BombusSat62-61
- BombusSat63-210
- BombusSat64-206
- BombusSat65-151
- BombusSat66-147
- BombusSat67-152
- BombusSat68-784
- BombusSat69-152
- BombusSat70-153
- BombusSat71-172
- BombusSat72-12
- BombusSat73-149
- BombusSat74-152
- BombusSat75-271
- BombusSat76-300
- BombusSat77-152
- BombusSat78-104
- BombusSat79-172
- BombusSat80-2362
- BombusSat81-152
- BombusSat82-649
- BombusSat83-617
- BombusSat84-140
- BombusSat85-170
- BombusSat86-351
- BombusSat87-255
- BombusSat89-156
- BombusSat90-82
- BombusSat91-82
- BombusSat92-145
- BardSat01-131
- BardSat02-167
- BvanSat01-803
- BvosSat01-390

Figura 2 - Landscape (abundância versus divergência) para as famílias de satDNAs identificados nos genomas das espécies do subgênero *Pyrobombus*. Note a predominância da família BombusSat19-30 nas três espécies.

4 DISCUSSÃO

A análise do satelitoma de seis espécies de *Bombus* mostrou que os satDNAs representam uma fração significativa da fração genômica analisada. Os valores de abundância desse componente repetitivo podem variar mesmo em espécies do mesmo subgênero, como *B. turneri* que tem 11,0878% de satDNA enquanto *B. skorikovi* possui mais que o dobro desse valor, 24,1019%. Variação na quantidade de satDNA entre espécies do mesmo gênero também já foi observada em abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, grupo irmão da tribo Bombini. No gênero *Melipona*, a análise e comparação do satelitoma de duas espécies, com grau de conteúdo heterocromático muito distintos, mostrou que essa variação pode ser muito maior. Em *M. scutellaris* com alto conteúdo heterocromático, o satDNA representou 38,41%, enquanto em *M. quadrifasciata*, com baixo conteúdo heterocromático, foi de apenas 2,83% (Pereira *et al.*, 2021).

Os monômeros dos satDNA de *Bombus* apresentaram ampla variação de tamanho, desde monômeros com 12pb (BombusSat72-12) a 13864pb (BombusSat31-13864). Em Meliponini, o menor satDNA descrito até o momento é o MquaSat07-20, com 20pb, em *M. quadrifasciata* (Pereira *et al.*, 2021), e o maior é o FvarSat03-1145, com 1145, em *Frieseomelitta varia* (Vignati *et al.*, 2025). Nessa tribo, os satDNA de monômeros com cerca de 145pb são os mais observados. Dos 30 satDNAs descritos até o momento, 12 possuem entre 145-147pb (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025). Em *Bombus*, mesmo apresentando ampla variação no tamanho dos satDNA (12pb a 13864), 36% possuem tamanho compreendido entre 140pb e 173pb. O comprimento modal foi 152 pb, não diferindo muito do que foi observado em Meliponini.

No gênero *Bombus* os satDNA são enriquecidos de AT, e os satDNAs exclusivos de cada espécie tendem a ser mais enriquecidos nessas bases, a exemplo, o satDNA BskoSat01-419 exclusivo de *B. skorikovi* apresentou 92.1% de AT. Enquanto a média de conteúdo AT para os satDNA compartilhados foi de 59,53%, nos satDNA não compartilhados a média é de 75,22%. O enriquecimento de AT nos satDNA também é descrito em Meliponini. Contudo, o maior conteúdo AT relatado até o momento em Meliponini foi em *F. varia* do satDNA que apresentou 72,5% (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025). Em insetos de modo geral, o satDNA rico em AT é frequente e acredita-se que esteja associado a uma função na curvatura do DNA, conduzindo a maior estabilidade do nucleossomo (revisado por Palomeque; Lorite, 2008).

Em abelhas sem ferrão, uma característica que parece ser tendência no satelitoma é que ele é composto predominantemente por uma família de satDNA que é muito mais abundante que as demais. Em *M. scutellaris*, por exemplo, que o genoma é composto de 38,41% de satDNA, distribuído em 13 famílias, o mais abundante constitui por volta de 99,46% dessa fração (Pereira *et al.*, 2021). Em de *T. hyalinata*, onde foram descritas oito famílias, o mais abundante, o ThyaSat01-301, representa 83,15% do satDNA (Pereira *et al.*, 2023). Resultado semelhante também ao encontrado em *F. varia*, em que o satDNA FvarSat01-306, corresponde a 88,84% do satelitoma (Vignati *et al.*, 2025). Embora, em Meliponini a predominância de um satDNA pareça ser uma tendência entre as espécies já estudadas, no gênero *Bombus*, das seis espécies aqui analisadas, duas, *B. turneri* e *B. vosnesenskii*, são as únicas que o satDNA mais abundante apresenta valores inferiores a 22% do satelitoma. Em *B. turneri*, o satDNA BombusSat01-4996 constitui cerca de 13,5% do satelitoma enquanto em *B. vosnesenskii*, o satDNA BombusSat19-30, 21,5%. Contudo, nas demais espécies de *Bombus* analisadas, verificamos que o satelitoma é predominantemente composto por apenas uma família de satDNA. O satDNA mais representado nestas espécies foi BombusSat19-30, com 44,14% em *B. bohemicus*, 55,11% em *B. skorikovi*, 49,01% em *B. ardens* e 45,49% em *B. v. nearcticus* do total de satDNA. O satDNA BombusSat19-30, que é o principal componente do satelitoma em *B. bohemicus*, *B. skorikovi*, *B. ardens* e *B. v. nearcticus* está presente também em *B. turneri* e *B. vosnesenskii*, contudo compondo uma fração muito menor do satelitoma. Em *B. turneri*, existem cinco satélites predominantes que apresentam valores semelhantes de abundância, um padrão diferente do que foi apresentado pelas outras espécies de *Bombus* e do que se tem observado em Meliponini (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025)

O único trabalho com satDNA em *Bombus* descreve o satDNA BT, com 420pb em *B. terrestris* (Rouleux-Bonnin; Bigot; Bigot, 2004), do subgênero *Bombus*, que pertence ao mesmo clado de *Pyrobombus* (Cameron; Hines; Williams, 2007; Williams *et al.*, 2008). A análise de transcrição do satDNA BT em *B. terrestris*, por meio de hibridização Northern blot e RT-PCR mostrou que a transcrição ocorre especificamente em uma fita de DNA dos embriões e em ambas as fitas nos adultos. Apesar da função específica desses não ser conhecida, foi sugerido que sua transcrição poderia interferir nos processos de desenvolvimento nesses insetos, dado que o satDNA BT foi transcrito igualmente em ambas as fitas nos adultos e uma fita é preferencialmente em embriões (Rouleux-Bonnin; Bigot; Bigot, 2004). Comparamos a sequência do satDNA BT com os recuperados pelo *RepeatExplorer* neste trabalho e verificamos

que o mesmo possui similaridade superior a 80% ao satDNA BombusSat54-422, presente nas seis espécies, que apresentam valores muito baixos de abundância, que variou de 0,0003% a 0,0072%.

A divergência dos satDNAs intraespecífica, quando avaliamos os diferentes satDNA da mesma espécie, ou interespecífica, quando comparamos a divergência do mesmo satDNA entre as espécies, mostrou uma ampla variação. Em *B. skorikovi*, os valores de divergência observados variaram de 3,02% (BombusSat62-61) a 38,69% (BombusSat41-169). Quando comparamos a divergência do mesmo satDNA entre espécies diferentes verificamos ampla variação na divergência, como o satDNA BombusSat31-13864, que é o satDNA com maior tamanho de monômero e presente em todas as espécies, em *B. vosnesenskii* esse possui divergência de 4,24%, no entanto em *B. ardens* a divergência do mesmo satDNA é de 30,66%.

Dos 92 satDNA compartilhados, 65 possuem valores de divergência superiores a 10% em todas as espécies. A divergência do satDNA está inversamente associada aos processos de amplificação e homogeneização e diretamente relacionada à taxa de mutação (Lorite *et al.*, 2004; Ruiz-Ruano *et al.*, 2018), assim é provável que a maioria dos satDNA de *Bombus* não tenham sido amplificados recentemente, o que explicaria o grande número de famílias com abundância inferior a 0,1% e a alta divergência apresentada pela maioria dos satDNAs.

Com relação ao satDNA BombusSat19-30, considerando a alta divergência média apresentada (16,67%), sugere que esse satDNA não tenha sido amplificado recentemente e em nenhuma das espécies, e já estaria presente em alta abundância no ancestral comum dessas espécies, mas que em *B. turneri* e *B. vosnesenskii* essa satDNA passou por ciclos de retração, que no caso de *B. turneri* impactou significativamente o conteúdo de satDNA. Além disso, foi sugerido que o comprimento da unidade de repetição do satDNA é um fator determinante para degeneração, visto que em satDNA mais curtos ela seria mais rápida, possivelmente pois os monômeros curtos degeneram mais rapidamente, visto que cada mutação teria efeito proporcional maior de degeneração para monômeros curtos do que para longos (Camacho *et al.* 2022). De acordo com Camacho *et al.* (2022), a análise das paisagens repetidas é uma boa opção para observar a função da amplificação na evolução do satDNA, pois as famílias que exibem curvas com alta abundância e baixa divergência são aquelas que adquirem relevância por meio da amplificação.

Diferente do observado nas abelhas sem ferrão dos gêneros *Trigona* e *Frieseomelitta* (Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025), nas espécies de *Bombus* o satDNA mais abundante não está entre os dois menos divergentes das espécies. Todavia, os satDNA mais abundantes de *T. hyalinata* e *F. varia* possuem comprimento da unidade repetida em torno

de 300pb, que é 10 vezes maior que o satDNA BombusSat19-30, com apenas 30pb (Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025).

A quantidade de satDNA no genoma não está associada com o número de famílias. Enquanto *B. skorikovi* possui 24,1019% de satDNA no genoma e 90 famílias, *B. turneri* que possui 91 famílias possui fração muito menor de satDNA no genoma (11,0878%). Assim como já relatado em Meliponini, a quantidade de satDNA parece está relacionada a abundância de algum satDNA em específico (Pereira *et al.*, 2021; Pereira; Cabral de Melo; Lopes, 2023; Vignati *et al.*, 2025), que no caso de *B. skorikovi* é o BombusSat19-30 que constitui 55,11% do satelitoma.

O satDNA BombusSat88-51 é compartilhado apenas por espécies do subgênero *Psithyrus*, enquanto o BombusSat91-81 pelas do subgênero *Pyrobombus*. A variação no conteúdo de satDNA do genoma frequentemente segue um sinal filogenético (Lima; Ruiz-Ruano, 2022) o poderia justificar a presença desses satDNA apenas em espécies do mesmo subgênero. Apesar da maioria dos satDNA serem compartilhados pelas seis espécies, todas as espécies possuem pelo menos um satDNA exclusivo. Determinar se algumas dessas famílias não compartilhadas surgiram de novo não é simples (Camacho *et al.*, 2022).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram que o satelitoma das espécies de *Bombus* é composto por um grande número de famílias, a maior parte compartilhadas entre todas as espécies. Entretanto, a maioria desses satDNAs apresentam abundância muito baixa e divergência alta. Das seis espécies analisadas, em quatro delas observamos o que parece ser um padrão em Meliponini, que é uma família de satDNA muito mais representada no genoma que as demais. Ademais, o satelitoma das espécies de *Bombus* parece diferenciar-se mais em termos quantitativos (abundância e divergência), do que qualitativos, dado que apenas 8% dos satDNA encontrados são exclusivos de determinada espécie. Considerando a diversidade de espécies de gênero, é importante que mais espécies sejam analisadas no futuro para confirmar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. A. *et al.* The evolutionary history of bees in time and space. **Current Biology**, v. 33, n. 16, p. 3409–3422, 2023.
- BACHMANN, L. *et al.* Satellite DNA as a taxonomic marker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, p. 3–11, 1993.
- CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–24, 2022.
- CAMERON, S. A.; HINES, H. M.; WILLIAMS, P. H. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 161–188, 2007.
- CROWLEY, L.; SIVELL, O. University of Oxford and Wytham Woods Genome Acquisition Lab *et al.* The genome sequence of the Tree Bumblebee, *Bombus hypnorum* (Linnaeus, 1758). **Wellcome Open Research**, v. 8, p. 21, 2023.
- DODSWORTH, S. *et al.* Genomic repeat abundances contain phylogenetic signal. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 112–126, 2015.
- DRUMMOND, A. *et al.* **Geneious** v4.8. 2009. Disponível em: <http://geneious.com>. Acesso em: set. 2024.
- HERAGHTY, S. D. *et al.* De novo genome assemblies for three North American bumble bee species: *Bombus bifarius*, *Bombus vancouverensis*, and *Bombus vosnesenskii*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 8, p. 2585–2592, 2020.
- KOCH, J. B. U. *et al.* Chromosome-scale genome assembly of the hunt bumble bee, *Bombus huntii* Greene, 1860, a species of agricultural interest. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 14, n. 10, p. jkae160, 2024.
- LEPECO, A. *et al.* Phylogenomic insights into the worldwide evolutionary relationships of the stingless bees (Apidae, Meliponini). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 201, p. 108219, 2024.
- LIMA, L. G.; RUIZ-RUANO, F. J. In-depth satellitome analyses of 37 *Drosophila* species illuminate repetitive DNA evolution in the *Drosophila* genus. **Genome Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. evac064, 2022.
- LORITE, P. *et al.* Evolutionary dynamics of satellite DNA in species of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). **Gene**, v. 332, p. 159-168, 2004.
- MONTIEL, E. E. *et al.* Satellitome of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), the most diverse among insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 826808, 2022.
- MORA, P. *et al.* Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, v. 11, n. 7, p. 783, 2020.

- NOVÁK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3745–3776, 2020.
- PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564–573, 2008.
- PAULA FREITAS, F. C. *et al.* The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* - a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–26, 2020.
- PEREIRA, J. A. Evolução da c-heterocromatina baseada no estudo de sequências de DNA repetitivo em abelhas dos gêneros *Melipona* e *Trigona* (Apidae: Meliponini). 2022. 84f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2022.
- PEREIRA, J. A.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; LOPES, D. M. The Satellite DNAs Populating the Genome of *Trigona hyalinata* and the Sharing of a Highly Abundant satDNA in *Trigona* Genus. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 418, 2023.
- PEREIRA, J. A. *et al.* The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. **Chromosoma**, v. 130, p. 251–262, 2021.
- RASMUSSEN, C.; CAMERON, A. S. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 206–232, 2010.
- ROULEUX-BONNIN, F.; BIGOT, S.; BIGOT, Y. Structural and transcriptional features of *Bombus terrestris* satellite DNA and their potential involvement in the differentiation process. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 877–888, 2004.
- 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**, v. 127, p. 323–340, 2018.
- RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28333, 2016.
- SAM, D. H. *et al.* Whole genome sequencing reveals the structure of environment-associated divergence in a broadly distributed montane bumble bee, *Bombus vancouverensis*. **Insect Systematics and Diversity**, v. 6, n. 5, p. 1–5, 2022. DOI: 10.1093/isd/ixac025.
- ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs – From localized to highly dispersed genome components. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 742, 2023.
- SMIT, A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. **RepeatMasker Open-4.0**. 2013–2015. Disponível em: <http://www.repeatmasker.org/>. Acesso em: set. 2023.
- VIGNATI, Z. B. M. *et al.* Cytogenomics of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae) and the Sharing of a Satellite DNA Family in Several Neotropical Meliponini Genera. **Genes**, v. 16, n. 1, p. 86, 2025.

VITALES, D.; GARCIA, S.; DODSWORTH, S. Reconstructing phylogenetic relationships based on repeat sequence similarities. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 147, p. 106766, 2020.

WILLIAMS, P. H. *et al.* Bumblebees with big teeth: revising the subgenus *Alpigenobombus* with the good, the bad and the ugly of numts (Hymenoptera: Apidae). **European Journal of Taxonomy**, v. 892, p. 1–65, 2023.

WILLIAMS, P. H.; LOBO, J. M.; MESEGUER, A. S. Bumblebees take the high road: climatically integrative biogeography shows that escape from Tibet, not Tibetan uplift, is associated with divergences of present-day *Mendacibombus*. **Ecography**, v. 41, n. 3, p. 461–477, 2018.

WILLIAMS, P. H.; JEPSEN, S. **IUCN BBSG – Bumblebee Specialist Group Report 2013**. London: Natural History Museum, 2014.

WILLIAMS, P. H. *et al.* A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 46–74, 2008.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- A análise citogenômica de *Frieseomelitta varia* mostrou que o satelitoma dessa espécie é composto predominantemente por uma família de satDNA de origem antiga no Clado 3 de Meliponini Neotropical, compartilhada entre diferentes gêneros e associada à região de heterocromatina centromérica e pericentromérica.
- No gênero *Partamona*, não há diferenças qualitativas na composição do satelitoma das espécies analisadas. No entanto, foram verificadas diferenças quantitativas entre as espécies, sugerindo que aquelas do clado A possuem uma menor quantidade de satDNA em comparação com as do clado B.
- O satDNA *PartamonaSat01-316* é predominantemente o mais abundante e menos divergente no satelitoma das espécies de *Partamona*. Esse satDNA é o principal componente da heterocromatina centromérica e pericentromérica. Além disso, está presente em todos os cromossomos B, sendo o principal componente dos cromossomos encontrados em populações do norte do Espírito Santo e sul da Bahia.
- No gênero *Bombus*, o satelitoma é composto por um grande número de famílias de satDNA, sendo a maioria compartilhada entre todas as espécies, apresentando baixa abundância no genoma e alta divergência. A maioria das espécies possui uma família de satDNA altamente abundante como principal componente do satelitoma, um padrão semelhante ao observado em Meliponini. A principal diferença observada entre as espécies é em termos de abundância e divergência entre as espécies, pois qualitativamente a maioria das famílias é compartilhada por todas as espécies.