


---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**ANA BEATRIZ STEIN MACHADO FERRETTI**

**DNA RIBOSSOMAL 45S NO GAFANHOTO  
*ABRACRIS FLAVOLINEATA* (ACRIDIDAE):  
ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA,  
ESTRUTURA MOLECULAR E PADRÕES  
EVOLUTIVOS**



Rio Claro  
2016

ANA BEATRIZ STEIN MACHADO FERRETTI

DNA RIBOSSOMAL 45S NO GAFANHOTO *ABRACRIS  
FLAVOLINEATA* (ACRIDIDAE): ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA,  
ESTRUTURA MOLECULAR E PADRÕES EVOLUTIVOS

Orientador: DIOGO CAVALCANTI CABRAL-DE-MELLO

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

Rio Claro  
2016

591.15 Ferretti, Ana Beatriz Stein Machado  
F387d DNA ribossomal 45s no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Acrididae) :  
organização cromossômica, estrutura molecular e padrões evolutivos / Ana  
Beatriz Stein Machado Ferretti. - Rio Claro, 2016  
34 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello

1. Genética animal. 2. Evolução da sequência de DNA ribossomal 45S.  
3. DNA repetitivo. 4. Família multigênica. 5. FISH. 6. Genoma. 7.  
Polimorfismo cromossômico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, todos da minha família, eles são e sempre serão a base de tudo.

Agradeço também todos aqueles amigos de longa data que estarão sempre comigo nas lembranças e no coração. Também agradeço todos os bons amigos que fiz na faculdade e ao querido CBN 11, as melhores lembranças da faculdade são com vocês.

Agradeço a oportunidade do intercambio e a todos e tudo que pude conhecer e viver naquele ano, com certeza fizeram de mim alguém melhor.

Agradeço aos professores queridos que me estimularam a estudar e a ir mais longe, naquele tipo de matéria que fazia os meus olhos brilharem, em particular Alessandra Fidelis, Patricia Parise e a querida Dora.

E em especial, ao Diogo Cabral-de-Mello, tanto pelas ótimas matérias ministradas quanto pela orientação, assim como os amigos do grupo GECEA que tanto me ajudaram, ensinaram e sempre me apoiaram durante essa longa e (ao mesmo tempo) rápida jornada e que fizeram do dia-a-dia do laboratório algo mais leve e feliz.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa minha formação, muito obrigada.

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós." (Antoine de Saint-Exupéry). Obrigada por terem feito parte dessa jornada.

"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos"

Friedrich Nietzsche

## Resumo

Em eucariotos os DNAs ribossomais estão envolvidos na formação do ribossomo e são organizados em duas famílias gênicas (DNAr 5S e 45S). Essas sequências são majoritariamente repetidas em tandem e arranjadas em um ou mais locus, localizado em um ou múltiplos cromossomos. Em gafanhotos estes genes foram estudados basicamente do ponto de vista cromossômico com descrição de número e localização de sítios em distintas espécies. No gafanhoto *Abracris flavolineata* coletados na região de Rio Claro/SP foi documentada ampla variação para o DNAr 18S intrapopulacionalmente com ocorrência de sítios de cinco a nove cromossomos. Esta ampla variação tem também sido observada em outras populações por nós estudadas, entretanto as causas para este padrão não foram ainda entendidas. Neste trabalho buscamos elucidar a estrutura molecular e padrões evolutivos das sequências de DNAr 18S no genoma da espécie *A. flavolineata*. Utilizamos ferramentas de citogenética clássica (coloração com nitrato de prata), mapeamento por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) do DNAr 18S e análises genômicas a partir do genoma inteiro sequenciado da espécie por Illumina hiseq 2000. Foram utilizados 48 indivíduos coletados em seis pontos de coleta. Os dados foram analisados de maneira integrada buscando entender as causas desta ampla variabilidade do ponto de vista intra- e inter-populacional. As análises por FISH confirmam a variabilidade do DNAr 18S para todas as populações estudadas apresentando entre 6 a 11 cromossomos marcados entre os indivíduos de diferentes populações, tendo média geral de 8,4 por indivíduo. Ocorreram marcações em todos os indivíduos nos cromossomos 1, 3, 6 e 9 e também foi reportado variação de tamanho do cluster e heteromorfismos de um modo disperso. Do ponto de vista populacional, os resultados não mostraram nenhum padrão fixo entre as populações de mesma região ou entre as distantes. A cluster de rDNA45S inteiro em um indivíduo de *A. flavolineata* apresentou diferentes coberturas tanto nos genes conservados (18S, 5.8S e 25S), quanto nos espaços transcritos internos (ITS 1 e ITS 2) revelando que grande parte das cópias são pseudogenes. Também foi observada a existência dos transposons Nimb e R2 porém eles não tem capacidade de transportar sequências. Isso mostra que pode estar ocorrendo dispersão por recombinação ectópica, ocorrência de DNA extra cromossômico ou ainda por transposons que não estão localizados no 45S. As análises por nitrato de prata apresentaram expressão em todos os indivíduos no cromossomo 9 mostrando que esse sítio não está se movendo e que provavelmente é um sítio ancestral. O cromossomo 10 apresentou atividade em vários dos indivíduos estudados, porém em alguns casos não apareceu na FISH, indicando que esse pode ser um locus crítico podendo representar a origem de mudança na localização do DNAr uma vez que sua expressão é significativa e sua amplificação pode ainda não ter ocorrido, concordado mais parcimoniosamente com o modelo 'dispersão-amplificação-deleção'.

**Palavras-chave:** DNA repetitivo, família multigênica, FISH, genoma, polimorfismo cromossômico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1 O DNA ribossomal 45S.....	6
1.2. Mapeamento cromossômico do DNAr 45S em gafanhotos.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais e preparações cromossômicas.....	11
3.2. Nitrato de prata.....	11
3.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	11
3.4. Sequenciamento e análise genômica.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
7. ANEXO I: Chromosomal dynamics, molecular organization and evolutionary patterns of major ribosomal DNA in the grasshopper <i>Abracris flavolineata</i> (Acrididae).....	17

## 1. Introdução

### 1.1. O DNA ribossomal 45S

A extensa variação de tamanho e composição dos genomas eucarióticos tem sido atribuída a diferentes DNAs repetitivos, sendo que esses elementos representados por algumas famílias multigênicas, DNAs satélites, microssatélites, minissatélites e elementos de transposição (CHARLESWORTH et al., 1994; GREGORY, 2005). Como algumas funções das sequências repetitivas, destaca-se a organização e funcionalidade dos telômeros e centrômeros, regulação gênica, perfeita segregação cromossômica, reparo e replicação do DNA e diferenciação dos cromossomos sexuais e supranumerários. Além disso, algumas destas sequências, em especial as famílias multigênicas, estão envolvidos na codificação de importantes proteínas e RNAs atuam na organização e metabolismo celular (ANLEITNER; HAYMER, 1992; KRAEMER; SCHMID, 1993; MESSIER, 1996; MARTINS, 2007). Estes elementos também estão envolvidos na formação da heterocromatina e em processos de regulação gênica (SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BIÉMONT; VIEIRA, 2006; FESCHOTTE; PRITHAM, 2007).

Dentre dos DNAs repetitivos, as famílias multigênicas são grupos de genes descendentes de um ancestral comum que apresentam similaridade em estrutura e função (NEI; ROONEY, 2005). Uma das famílias multigênicas mais estudadas do ponto de vista cromossômico e molecular é a de DNA ribossomal (DNAr), incluindo o DNAr 45S e 5S. Essas famílias são repetidas em tandem nos genomas e arranjadas em um ou mais locus, localizado em um ou múltiplos cromossomos. O maior cluster de DNA ribossomal é o DNAr 45S formado por três genes conservados 18S, 5.8S e 25S, espaços transcritos externos (ETS 1 e ETS2), espaços transcritos internos (ITS 1 e ITS 2) menos conservados e um espaço intergênico não transcrito (Figura 1). Enquanto o menor cluster é o DNAr 5S, que consiste em uma unidade transcricional de aproximadamente 120 pb separada do próxima unidade por um espaços não transcrito (NTS). O DNAr 5S apresenta alta conservação enquanto que as regiões NTS são variáveis tanto em tamanho como na composição, mesmo em grupos filogeneticamente relacionados (NEI; ROONEY, 2005; EICKBUSH; EICKBUSH, 2007)

Por causa do massivo número de ribossomos necessários durante períodos de rápido crescimento, em eucariotos geralmente existem centenas a milhares de cópias dessas unidades de transcrições. Estudos sugerem que existiram apenas pequenas mudanças na sequência dos genes de DNA ribossomal entre os bilhões de anos da separação de animais e plantas (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).



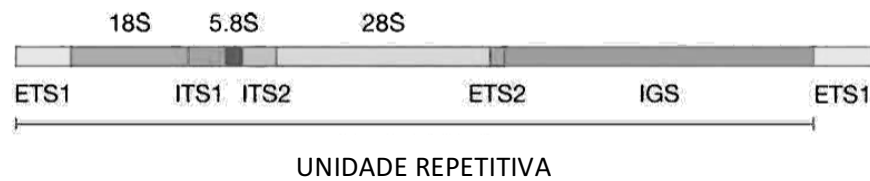


Figura 1: Esquema do DNAr 45S mostrando o arranjo dos genes (18S, 5,8S e 28S), dos espaçadores transcritos internos (ITS 1 e ITS 2), externos (ETS 1 e ETS 2) e do espaço intergênico não transcrito (IGS). (Figura adaptada de NEY; ROONEY, 2005)

De acordo com Nei e Rooney (2005), o mecanismo que tem sido usado para explicar como o gene de 45S evolui é o de evolução em concerto, onde *crossing over* desigual ocorre aleatoriamente e a repetição deste processo pode levar à homogeneização dos genes dentro de uma família, como foi estudada por Brown et al. (1972) no anfíbio *Xenopus laevis* que mostrava sequências de nucleotídeos muito similares entre os membros da mesma espécie e diferiam apenas 10% entre membros de diferentes gêneros (*X. laevis* e *X. mulleri*). Esse tipo de homogeneização foi também estudado por Parkin e Butlin (2004), em gafanhotos (*Chorthippus parallelus*) de quatro populações diferentes da França e Espanha e revelou a existência de um nível significativo de variação entre os indivíduos em cada população estudada para as regiões ITS1. Os autores sugeriram que o processo de evolução em concerto é relativamente lento para causar a especiação no momento.

Todavia existe também o modelo do nascimento e morte onde novos genes são criados por duplicação sendo alguns dos genes mantidos por longo tempo no genoma enquanto que outros são deletados ou se tornam não funcionais, se tornando pseudogenes. Rugeiro et al. (2004), descreveu pseudogenes e sequências funcionais em seu estudo com *Halophila stipulacea* comparando populações de algas nativas e introduzidas. Foi relatado alto grau de variabilidade intraindividual na regiões de ITS devido ao polimorfismos existentes nos pseudogenes. Alto nível de polimorfismo foi também encontrado nas regiões ITS por Razafimandimbison et al. (2004) em três espécies da família Rubiaceae (*Adinauclea fagifolia*, *Haldina cordifolia*, e *Mitragyna rubrostipulata*). Em *A. fagifolia* encontraram uma mistura de genes funcionais e pseudogenes altamente diferentes enquanto que nas outras duas espécies as regiões eram formadas majoritariamente por pseudogenes.

Entretanto, os dois modelos de evolução podem coexistir no organismo. Em estudo realizado em DNA ribossômico 5S na família de arraias Potamotrygonidae os autores relataram que variantes do DNAr 5S foram geradas por ciclos de duplicação e eram mantidas ou eliminadas por mecanismos de nascimento e morte sob intensa seleção purificante.

Simultaneamente, distintos clusters no genoma estavam independentemente homogeneizados, resultando em sequências altamente similares devido à evolução em concerto (PINHAL et al., 2011)

Durante a síntese dos ribossomos os loci de DNAr 45S ativos formam nucléolos visíveis nas células, as Regiões Organizadoras de Nucléolo, RONs (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007; MANTOVANI et al., 2005). A detecção dos clusters de DNA 45S ativos com impregnação de nitrato de prata vem sendo realizada, devido à simplicidade desse método, para evidenciar as RONs que podem servir como marcadores para estudos comparativos entre cariótipos buscando elucidar padrões evolutivos. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é também utilizada para localização dos clusters de DNAr, todavia, não necessariamente ativos. A combinação da FISH com a técnica de impregnação com por nitrato de prata é um excelente modo para determinar a quantidade e localização dos clusters de DNAr 45S ativos ou silenciosos (CABRERO et al., 2008).

A localização da região de RON e dos clusters de DNAr usualmente tem revelado variações intra e interespecíficas, principalmente do ponto de vista interpopulacional. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar essa variação, dos quais destacam-se rearranjos cromossômicos estruturais, recombinação ectópica, transposição e ocorrência de DNAs extra cromossômico (eccDNA, *extra chromosomal DNA*) (CASTILHO; HESLOP-HARRISON, 1995). Raskina et al. (2008), evidenciou que clusters de DNAr podem se mover sem rearranjos cromossômicos, isso aconteceria por meio de transposons que tem a habilidade de capturar genes inteiros e movê-los para outras partes do genoma.

A partir de comparações de mapeamentos genéticos de genoma de Triticeae, Dubkovsky e Dvorak (1995) sugeriram um mecanismo para explicar a variação da localização da região de RON sem ocorrência de rearranjos cromossômicos. Esse mecanismo baseia-se na existência de um pequeno loci, contendo algumas cópias de DNAr, que pode se mover em cromossomos específicos ou entre cromossomos por dispersão e amplificação (CABRERO et al., 2008). Schubert e Wobus (1985), afirmaram que elementos individuais (genes órfãos) derivados de cópias DNAr de diferentes locus cromossômicos (CHILDS et al., 1981) indetectáveis por impregnação de nitrato de prata, podem, sob certas condições, amplificar rapidamente e formar RONs funcionais. Esse estudo vem ganhando suporte de outros estudos que mostram a existência de um pequenos loci de DNAr em outras espécies de Triticeae como *Thinopyrum* (LI; ZHANG, 2002) e *Hordeum* (TAKETA et al., 2005), e tem também sido utilizada para explicar a origem e variação da distribuição do loci de DNAr. O envolvimento direto dos

transposons *En/Spm* em DNAr foi demonstrado por Raskina et al. (2004), através de análises em *Aegilops speltoides*, suportando a hipótese de Dubkovsky e Dvorak (1995).

## 1.2. Mapeamento cromossômico do DNAr 45S em gafanhotos

Em gafanhotos, o uso de DNAr 45S em análises se restringe basicamente a descrição do número e localização dos clusters de 45S e de 5S, sendo que ainda não foi realizado um estudo mais aprofundado sobre a evolução que abrangesse tanto a citogenética clássica e a biologia molecular para o entendimento dos padrões evolutivos das sequências.

Cabrero e Camacho (2008) analisaram a distribuição do DNAr em duas subfamílias de gafanhotos, Gomphocerinae e Oedipodinae. Em Gomphocerinae os cromossomos 2, 3 e X frequentemente continham DNAr enquanto que em Oedipodinae os cromossomos 6 e 9 eram os que apresentavam o DNAr. Aproximadamente 13% dos 126 loci de DNAr detectados por FISH estavam inativos. Além disso, os autores relataram que é comum encontrar regiões com atividade de nucléolo em locais que a FISH não detecta presença de DNAr 45S (CABRERO; CAMACHO, 2008). Esses loci crípticos podem representar a origem para futuras mudanças na localização do DNAr uma vez que passam por amplificação significativa (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011).

No trabalho de Cabral-de-Mello et al. (2011), foi feita uma comparação entre as marcações de FISH do DNAr 5S de seu próprio trabalho com as marcações feitas por Cabrero e Camacho (2008), nas 24 espécies que ambos os trabalhos tem em comum. Foi constatado que apenas 19,7% dos clusters de DNAr 5S foram encontrados no mesmo local que o DNAr 45S, sendo proximal 15% e intersticial 4,7%. Os 80,3% de clusters de DNAr 5S estavam localizados em regiões diferentes das do 45S DNAr. No trabalho, os gafanhotos mostraram uma extensiva variação no número de sítios de DNAr, mas essa variação não é correlacionada ente as famílias de 5S e 45S, sendo que algumas espécies tem um pequeno número de sítios para ambas as famílias de DNAr e outras espécies apresentam poucos cromossomos com presença de uma das famílias e a outra aparecendo na maioria dos cromossomos.

Um estudo sobre evolução foi feito no gafanhoto *Podisma pedestris* por Keller (2011), utilizando PCR em tempo real e encontraram oito grupos distintos de ITS1 nos indivíduos, enquanto que mutações nos sítios de 18S estavam perfeitamente conservadas indicando que em alguns grupos existiam pseudogenes, sendo que sua frequência poderia ser possivelmente mais alta do que a dos genes funcionais, evidenciando baixa taxa de homogeneização. A possível causa associada seria o grande tamanho do genoma de *P. pedestris* que promoveria uma lenta remoção dos pseudogenes.

Em estudos com *Abracris flavolineata* foi constatada a presença de DNA ribossomal 5S em múltiplos loci, que é comum para gafanhotos, como descrito no trabalho de Cabral-de-Mello et al. (2011), e foi observada em todos os indivíduos, a conservação do cluster distal no braço longo de autossomo 1, dois clusters intersticiais no autossomo 2 e um cluster proximal no autossomo 5 (BUENO et al., 2013). Porém observou-se uma grande variação entre os indivíduos nas análises do 18S, apresentando uma variação entre 5 a 9 no número de cromossomos marcados, incluindo autossomos e o cromossomo sexual. Essa variação foi vista em indivíduos pertencentes à população de Rio Claro-SP. Sendo assim, esse trabalho buscará entender, do ponto de vista evolutivo, essa variação já encontrada na população de Rio Claro e analisar também outras populações de diferentes regiões do Brasil e Argentina como detalhado nos objetivos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Entender a organização e possíveis causas da ampla dispersão/variabilidade dos sítios de DNAr no gafanhoto *Abracris flavolineata*.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Entender a organização e padrões de dispersão do ponto de vista cromossômico dos sítios de DNAr 18S em distintas populações de *Abracris flavolineata*, utilizando a hibridização *in situ* fluorescente, buscando inferir sobre seus padrões de evolução.
2. Checar se a dispersão dos sítios de DNAr ocorre exclusivamente para o 18S ou para o cluster inteiro de DNAr 45S.
3. Checar a atividade dos sítios de DNAr a partir do uso do nitrato de prata, buscando entender se existem sítios preferencialmente expressos.
4. Reconstruir a estrutura da sequência do DNAr 45S e sequências associadas, utilizando dados de *next generation sequencing* (NGS), para entendimento das possíveis causas da dispersão observada na população de Rio Claro/SP.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Animais e preparações cromossômicas**

Um total de 48 machos adultos de *Abracris flavolineata* foram coletados em cinco regiões do Brasil, Rio Claro/SP (São Paulo); Colina/SP; Murici/AL (Alagoas); Cabo/PE (Pernambuco) e Sta. Bárbara do Pará/PA (Pará), e também em Posadas/Misiones, Argentina. Os folículos testiculares foram fixados em Carnoy (3:1, Etanol:Ácido acético) e armazenados em freezer para as análises cromossômicas. Os indivíduos inteiros para extração de DNA estão armazenados em etanol 100% em freezer -20 °C no Laboratório de Citogenética da UNESP/Rio Claro. As lâminas serão obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento e coradas com Giemsa 5% para análises convencionais ou sem coloração para posterior realização de FISH.

#### **3.2. Nitrato de Prata**

A técnica de Nitrato de Prata será feita de acordo com protocolo descrito por Rufas et al. (1987).

#### **3.3. Hibridização *in situ* fluorescente**

As sequências de DNAs repetitivos obtidas por PCR foram marcadas com Digoxigenina 11-dUTP, seguindo recomendações do fabricante. A hibridização *in situ* fluorescente seguirá basicamente o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações propostas por Cabral-de-Mello et al. (2010), e as sondas serão detectadas usando-se anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche). Outras formas de marcação ou detecção poderão eventualmente serem usadas. Todas as preparações serão contracoradas com DAPI e montadas com meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). As fotografias e sinais serão observadas utilizando-se um microscópio Olympus BX61 equipado com uma lâmpada fluorescente e filtros adequados. As imagens serão fotografadas utilizando-se uma câmera digital DP70 em escala cinza. Adicionalmente, as imagens serão pseudocoloridas em cinza (cromossomos) e vermelho (sinais), sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste usando-se Adobe Photoshop.

#### **3.4. Sequenciamento e análise genômica**

Indivíduos machos *A. flavolinea* encontram-se estocados a -80 °C para isolamento do DNA genômico. Em seguida, o DNA de machos foi extraído utilizando o kit Qiagen DNeasy (Qiagen Inc., CA, USA), seguindo o protocolo dos fabricantes. Para preparação das bibliotecas genômicas de Illumina o DNA genômico de machos foi sonificado para obtenção de fragmentos

de ~500 pares de base. As bibliotecas foram construídas utilizando o kit TruSeq DNA (Illumina Inc). Finalmente o sequenciamento de cada biblioteca foi realizado utilizando o sequenciador Illumina HiSeq 1000. Os genomas sequenciados foram principalmente utilizados para busca da sequência de DNA 45S e fragmentos relacionados.

Para a busca de sequências, os *reads* obtidos do sequenciamento foram unidos utilizando o programa fastq-join do FASTX- toolkit (GORDON; HANNON, 2010) com as opções básicas de entrada dos dados. As sequências foram clusterizadas utilizando o RepeatExplorer (NOVÁK et al., 2013) e será realizada uma busca baseada na densidade dos gráficos que é uma característica típica dos DNAs repetitivos (quanto mais densos, mais repetições ocorrem no genoma analisado). Foi realizado o BLAST da sequências e posteriormente o DNA ribossomal foi recuperado para ser montado usando o programa Newbler. Depois do DNAr 45S ter sido reconstruído ele foi utilizado novamente em uma análise de BLAST para buscar possíveis sequências associadas.

#### **4. Resultados e discussão**

Os dados obtidos neste trabalho estão apresentados em formato de manuscrito a ser submetido a revista “Insect Molecular Biology” (anexo I). O mesmo já se encontra em fase final de correção para submissão.

#### **5. Conclusões gerais**

Os dados obtidos mostram grande variação do loci de 18S em número, nos cromossomos marcados, tamanho do sítio e heteromorfismo em todas as populações estudadas. A presença de numerosos pseudogenes indica evolução por nascimento e morte e, além disso, ocorreu alta incidência de sítios silenciosos e locus crípticos concordando com o modelo ‘dispersão-amplificação-dispersão’. As prováveis causas para a variação encontrada no DNAr 45S são recombinação ectópica, DNA extra cromossomal e/ou transposição.

## 6. Referências bibliográficas

ANLEITNER, J.; HAYMER, D. Y. Enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Chromosoma*, v. 101, p. 271-278, 1992.

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

BORN, G.G.; BERTOLLO, L.A.C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR bearing X chromosome. *Chromatography Research*, v. 8, p. 111-118, 2000.

BROWN, D.D.; WENSINK, P.C.; JORDAN, E. *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *Journal of Molecular Biology*, v. 63, p. 57-73, 1972.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. doi:10.1371/journal.pone.0066532. *Plos One*, v. 8 2013

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CABRERO, J.; LOÓPEZ-LEOÓN, M.D.; CAMACHO, J.P.M. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica*, v. 139, p. 921-931, 2011

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DANN similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, v. 104, p. 393-400, 2010

CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research*, v. 16, p. 595-607, 2008.

CAI, Q.; ZHANG, D.M.; LIU, Z.L.; WANG, X.R. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany*, v. 97, p. 715-722, 2006.

CAI, Q.; ZHANG, D.M.; LIU, Z.L.; WANG, X.R. *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany*, v. 97, p. 715-722, 2006.

CASTILHO, A.; HESLOP-HARRISON, J.S. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome*, v. 38, p. 91-96, 1995.

CASTRO, J.; RODRIGUEZ, S.; PARDO, B.G.; SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, P. Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*, v. 86, p. 291-302, 2001.

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

CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R.H.; KEDES, L. Orphons: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. *Cell*, v. 23, p. 615-663, 1981.

DATSON, P.M.; MURRAY, B.G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research*, v. 14, p. 846-857, 2006.

DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Ribosomal RNA multigene loci - Nomads of the Triticeae genomes. *Genetics*, v. 140, p. 1367-1377, 1995.

EICKBUSH, T.H.; EICKBUSH, D.G. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, v. 175, p. 477-485, 2007.

FERRO, D.A.; NÉO, D.M.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A. Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica*, v. 110, p. 55-62, 2001.

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

GALETTI JR. P.M. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology*, v. 65, p. 53-56, 1998.

GREGORY, T.R. Genome size evolution in animals. In: GREGORY, T.R. (Org.) *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier, 2005.

GORDON, A.; HANNON, G.J.; Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads preprocessing tools. Disponível em: <[http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)> Acesso em 20 fev 2015

KELLER, I.; CHINTAUAN-MARQUIER, I. C.; VELTSOS, P.; NICHOLS, R. A. Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution. *Genetics*, v. 174, p. 863-874, 2006.

KRAEMER, C.; SCHMIDT, E.R. The sex determination region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma*, v. 102, p. 553-562, 1993.

LI, D.Y.; ZHANG, X.Y. Physical localization of the 18S-5 center dot 8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticeae): implications for concerted evolution. *Annals of Botany*, v. 90, p. 445-452, 2002.

LORETO, V. CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P.M.; SOUZA, M.J. Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research*, v. 16, p. 233-241, 2008.

MANTOVANI, M.; ABEL, D.S.; MOREIRA-FILHO, O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, v. 123, p. 211-216, 2005.



MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: PISANO, E. et. al. (Orgs.) Fish Cytogenetics. New Hampshire: Science Publisher, 2007.

MCCLINTOCK, B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *ZZellforsch*, v. 21, p. 294-328, 1934.

MESSIER, W.; LI, S.H.; STEWART, C.B. The birth of microsatellites. *Nature*, v. 381, p. 483, 1996.

MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O.J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research*, v. 101, p. 235-243, 1976

NAKAJIMA, R.T.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; VENERE, P.C.; MARTINS, C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 198, 2012.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 121-152, 2005.

NGUYEN, P. et al. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, v. 138, p. 343-354, 2010.

NOVAK, P.; NEUMANN, P.; PECH, J.; STEINHAISSL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, v. 29, p. 792-793, 2013

OAKES, M.; NOGI, Y.; CLARK, M.W.; NOMURA, M. Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Molecular and Cell Biology*, v. 13, p. 2441-2455, 1993.

PARKIN, E.J.; BUTLIN, R.K. Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, p. 1595-1601, 2004.

PINKEL, D.; LANLEGENT, J.; COLLINS, C.; FUSCOE, J.; SEGRAVES, R.; LUCAS, J.; GRAY, J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* v. 85, p. 9138-9142, 1988

PINHAL, D.; YOSHIMURA, T. S.; ARAKI, C.S.; MARTINS, C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *Evolutionary Biology*, v. 11, p. 1-14, 2011

RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 120, p. 351-357, 2008.

- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Research*, v. 12, p. 153-161, 2004.
- RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; KELLOGG, E.A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae). *Systematic Biology*, v. 53, p. 177-192, 2004.
- RUGGIERO, M.V.; PROCACCINI, G. The rDNA ITS region in the Lessepsian marine angiosperm *Halophila stipulacea* (Forssk.) Aschers. (Hydrocharitaceae): intragenomic variability and putative pseudogenic sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 58, p. 115-121, 2004.
- RUFAS, J.S.; GIMENEZ-ABIAN, J.; SUJA, J. A.; GARCIA DE LA VEGA, C. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. *Genome*, v 29, p. 706-712, 1987
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.; MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2004
- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, v. 92, p. 143-148, 1985.
- SHAPIRO, J.A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function . *Biological Reviews*, v. 80, p. 1-24, 2005.
- TAKETA, S.; ANDO, H.; TAKEDA, K.; ICHII, M.; VON BOTHMER, R. Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany*, v. 96, p. 23-33, 2005.

**7. ANEXO I: Chromosomal dynamics, molecular organization and evolutionary patterns of major ribosomal DNA in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Acrididae)**

Ana B. S. M. Ferretti<sup>1</sup>, Francisco J. Ruiz-Ruano<sup>2</sup>, Érica Ramos<sup>3</sup>, Vilma Loreto<sup>4</sup>, Dardo A. Martí<sup>5</sup>, Juan P. M. Camacho<sup>2</sup>, Cesar Martins<sup>3</sup>, Diogo C Cabral-de-Mello<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>UGR – Univ de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética, Granada, Spain;

<sup>3</sup>UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB, Departamento de Morfologia, Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>UFPE – Univ Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas/CCB, Departamento de Genética, Recife, Pernambuco, Brazil;

<sup>5</sup>IBS - UNaM – CONICET, Posadas, Misiones, Argentina.

*Short running title: 18S ribosomal DNA in the grasshopper *Abracris flavolineata**

*\*Corresponding author: UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências/IB, Departamento de Biologia, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil Phone/Fax: 55 19 35264152. E-mail: mellodc@rc.unesp.br*

## Abstract

Eukaryotic ribosomal DNA are involved in formation of ribosome and it is organized in two multigenic families (rDNA 5S and 45S). These sequences are mostly tandemly repeated and organized in one or more loci, localized in one or multiple chromosomes. In grasshopper these genes were studied basically in the chromosomal view with description of number of loci and location in distinct species. In grasshopper *Abracris flavolineata* was documented huge variation for rDNA 18S intrapopulation in individuals collected in Rio Claro/SP region with occurrence of five to nine loci. This vast variation was also observed in other population studied for us, however, the causes for this pattern was not understood yet. In this work we search for elucidate the molecular structure and evolutionary patterns of the rDNA 18S in the genome of *A.flavolineata*. Was utilized classic cytogenetic techniques (silver nitrate staining), mapping of 18S for Hybridization *in situ* Fluorescent (FISH) and genomics analyses from entire sequenced genome by Illumina HiSeq 2000. Was utilized 48 individuals collected in six sampling places. The data was analyzed in an integrated pathway tracing to understand the causes of this huge variability in intra- and interpopulational view point. The analyses by FISH confirmed the variability of 18S rDNA for all six populations studied presenting between 6 and 11 chromosomes marked among the individuals of different populations, the general mean was 8.4 per individual. Occurred signals in all individuals in chromosomes 1, 3, 6 and 9 and also was reported variation of cluster size and heteromorphism appearing in a dispersed way. From the populational view, the populations did not present a fixed pattern in population from the same region or between the distant. The reconstruction of the complete 45S rDNA presented different coverages in the conserved genes (18S, 5.8S e 25S) and in the internal transcripts (ITS 1 e ITS 2) revealing that huge part of the copies are pseudogenes. Also was observed the presence of the transposons Nimb and R2, although they are not able to transpose sequences. It shows that may be happening dispersion by ectopic recombination, occurrence of extra chromosomal DNA or even by transposons not localized in the 45S cluster. Silver nitrate staining present expression in all individuals in chromosome 9 showing that this site is not moving and that it could be the ancestral cluster. The chromosome 10 present NORs in several studied individuals, however in some cases the signal was not present in FISH. It indicates that it is a critical locus that represents the source of change in location of 18S, once its expression is significant and its amplification may have not occurred yet. It agrees more partially with 'dispersion-amplification-deletion' model.

**Key-words:** repetitive DNA, multigenic family, genome, FISH, chromosomal polymorphism

## Introduction

Multigene families are groups of genes descendent of a common ancestral with similar structure and function (Nei and Rooney 2005). One of the most studied multigene families at chromosomal and molecular point to view are the ribosomal DNAs (rDNA). Those families are primarily tandemly repeated in the genomes and organized in one or multiple locus, variable in size, which can be located in one or many chromosomes. The major cluster of ribosomal DNA, i.e. the rDNA 45S, consists of three conserved genes 18S, 5.8S and 28S, two external transcribed spaces (ETS 1 and ETS 2) and two internal transcribed spaces (ITS 1 and ITS 2) that are less conserved, besides one intergenic space not transcribed (Nei and Rooney 2005, Eickbush and Eickbush 2007). Usually eukaryotes have hundred to millions of major rDNA copies once a massive number of ribosomes are needed during the periods of fast grow (Eickbush and Eickbush 2007). As results of the 45S rDNA transcription during the ribosome synthesis it is possible to see a visible nucleolus (Nucleolus Organizer Region – NOR) using silver nitrate staining.

The mechanism of concerted evolution explain how the rDNA genes evolve, where some molecular mechanisms, like, DNA recombination, repair, unequal crossing over, gene conversion and amplification happens randomly and the repetition of these processes cause sequence homogenization of a family (Liao et al. 1997, Liao 1999, Nei and Rooney 2005, Ganley and Kobayashi 2007). On the other hand, some authors also documented that the mechanisms based on the birth and death model are also governing the rDNAs evolution (Rooney 2004, Rooney and Ward 2005, Vierna et al. 2009, Eirín-López et al. 2012). In this case when new genes are created by duplication some of those genes are maintained in the genome but others are deleted or become not functional (pseudogenes). Nevertheless, the both model can coexist in the organisms (Freire et al. 2010, Pinhal et al. 2011, Bueno et al. 2016).

The macrochromosomal rearrangements, like translocation and fusion, could be responsible for rDNA sites movement for distinct chromosomes. Although for number of sites variability observed in diverse species some works proposed that it could be independent of macrochromosmoal rearrangements, being these patterns explained by transposition events (Schubert 1984, Shishido et al. 2000, Cai et a. 2006, Datson and Murray 2006). According to the model proposed by Dubcovsky and Dvorák (1995), i.e. ‘dispersion-amplification-deletion’, loci containing some copies of rDNA could be moved to a new chromosome, creating new small site that after amplification process could be converted in a major rDNA sites. This model was supported by the studies of plant species (Schubert and Wobus 1985) moreover the

involvement of Transposable elements (TEs) in the dispersion process was suggested (Reed and Phillips 2000, Raskina et al. 2004, Sola et al. 2004). The dispersion of rDNA sites could also be favored by the reinsertion of circular intermediates (Reed and Philips, 2004, Gornung 2013). According to Cabrero and Camacho (2008) among grasshoppers the 45S the model 'dispersion-amplification-deletion' could explain rDNA intra- and interchromosomal variability, observed through a combination of Fluorescent in situ Hybridization (FISH) and silver nitrate staining.

In the grasshopper *Abracris flavolineata* Bueno et al. (2013) detected a remarkable variability concerning loci number (from five to nine chromosomes labeled per haploid genome) and size of 18S rDNA in individuals belonging to the Rio Claro/SP population. This huge variation instigated us to continue the investigation for understand if this variability is also present in other populations and its possible causes. For this proposes we employed the FISH to detect 18S rDNA sites in more individuals belonging to Rio Claro/SP population and from other five locations from Brazil and Argentine. Moreover, to detect rDNA transcriptional activity we used silver nitrate staining and finally to detect possible sequences associated to DNAr 45S the entire sequence was reconstructed using the sequenced genome.

## **Materials and Methods**

### ***Animal sampling and chromosomal analysis***

A total of 48 *A. flavolineata* male individuals were used in this study. They were collected in five areas from Brazil, i.e. Rio Claro/SP (São Paulo); Colina/SP; Murici/AL (Alagoas); Cabo/PE (Pernambuco) and Sta. Bárbara do Pará/PA (Pará), and also in Posadas/Misiones, Argentina. The animals were anesthetized and testis follicles were dissected and fixed in Carnoy's solution (3:1, 100% ethanol:glacial acetic acid). Entire animals were stored in 100% ethanol for DNA extraction. Slides were obtained using classical technic of crush and staining with 5% Giemsa for conventional analyses or without staining for subsequent implementation of FISH. The silver nitrate staining was done accordingly the protocol described by Rufas et al. (1987).

The 18S rDNA sequence obtained through PCR were labeled with Digoxigenin 11-dUTP. The Fluorescent *in Situ* Hybridization was done following the Pinkel et al. (1986) protocol with modifications proposed by Cabral-de-Mello et al. (2010). The probes were detected using anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche). All the preparations were counterstained with with 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Chromosomes and signals were observed using an Olympus microscope BX61 equipped

with fluorescence lamp and appropriate filters. Photographs were recorded with a DP70 cooled digital camera. Images were merged and optimized for brightness and contrast with Adobe Photoshop CS2.

The signals observed were classified in two groups, large or small signals. The large signals occupied the pericentromeric region extending to the short chromosomal arm, while the small signals were represented by small dots in centromeric region. This specific location was confirmed through the analysis of meiotic and mitotic chromosomes (Supplementary Material 1).

### ***Genome sequencing and 45S rDNA cluster reconstruction***

The DNA of male individuals of *A. flavolineata* were extracted using the kit Qiagen DNeasy (Qiagen Inc., CA, USA) following the manufacturer protocol. The DNA was sonicated to obtain fragments of ~500 bp paired-ends libraries were prepared as recommended by Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Paired-ends (2x300) from Illumina reads were preprocessed to check the quality of the reads with FASTQC (Andrews, 2012) and using FASTX-Toolkit suit (Gordon and Hannon 2010) it was performed a trimming for quality. The paired-end reads were trimmed at 150 nt in length, and then were joined using the “fastq-join” software of the FASTX-Toolkit suit (Gordon and Hannon 2010) with default options.

The sequences were clustered using the RepeatExplorer (Novák et al. 2013) and it was conducted a search based on graph density characteristic of repetitive DNA. The BLAST of the sequences was performed and posteriorly the ribosomal DNA was recovered and it was assembled by Newbler program. Finally, after the recovery of rDNA it was used in BLAST analyses to search possible associated sequences.

## **Results**

### ***Chromosomal location of 18S rDNA and Nucleolar Organizer Regions***

The chromosomal mapping of 18S rDNA through FISH in 48 individuals from the distinct populations revealed extensive variability, mainly for four aspects: (i) number of cluster per haploid genome, (ii) specific chromosomes labeled and (iii) size of clusters and (iv) heteromorphism, i.e. presence of clusters only in one of the homologous. The variability was noticed for autosomes and X chromosome. Although the specific location of the rDNA clusters were conserved and they occurred invariably in the pericentromeric region of chromosomes, in some cases extending to the short arms (Figure 1, 2, Supplementary Material 2). The number of clusters varied from six (observed in individuals from Cabo/PE) to eleven (Colina/SP) per

haploid genome but frequently eight or nine clusters were frequently noticed. The mean of clusters was 8.4 per individual, considering haploid genomes. The population from Cabo/PE had the lower average (7.4), followed by Posadas/Misiones (8.0), Rio Claro and Sta. Bárbara (both with 8.3), Murici/AL (9.0) and the highest mean was observed for the population from Colina/SP (10.0).

Considering the entire sample and specific chromosomes the pairs 1, 3, 6 and 9 presented 18S rDNA signal for all the individuals. All chromosomes presented clusters at least in one of the individuals, being the chromosomes 7 and 11 rarely labeled, presenting frequency of labeling of 20.8% and 4.2%, respectively. The chromosome 11 revealed signals exclusively in individuals from Sta. Bárbara do Pará/PA. The other chromosomes presented variable frequency of labeling, as follows in decreasing order: X chromosome (91.7%), chromosome 2 (75%), chromosome 10 (64.6%), chromosome 4 (62.5%), and chromosomes 6 and 8 (58.3%). The frequency of clusters per chromosome was different depending of the specific population studied (Supplementary Material 3). Finally depending of the population and specific chromosome the size of clusters was variable, but primarily the size of signals was large (Figure 2). For chromosomes 1 and 9 the signals were exclusively large; large or small signals were observed on chromosomes 3 and 6; chromosomes 2, 10 and 11 presented large signals or absence of clusters; chromosome 8 presented small signal or absence of cluster; large or small signals or absence of clusters were noticed in chromosomes 4, 5, 7 and X. These patterns were variant depending of the population (Figure 2).

The random analysis, in one individual from each population, using silver nitrate impregnation revealed active NORs in the chromosome 9 for individuals from all populations. The chromosome 10 also revealed frequently silver nitrate impregnation, except in the individual from the population of Sta. Bárbara do Pará/PA. The chromosomes 1, 8 and 11 did not revealed silver nitrate impregnation for all individuals (Figure 3). Cryptic loci that are stained by silver nitrate staining but without FISH signals were noticed for chromosomes 4, 5 and 10 in the individual from Cabo/PE and chromosome 10 in individuals from from Murici/AL and Posadas/Misiones, Argentina.

### ***Sequence organization of 45S rDNA***

The analysis of 45S gene and spacers using sequenced genome data revealed a high variation of coverage, depending of the specific region studied. Most copies of 45S rDNA detected are truncated in distinct regions of genes, i.e 18S, 5.8S and 28S, or spacers, revealing that most part of 45S rDNA copies are pseudogenized. The reconstruction of entire monomer



of 45S rDNA permitted the identification of associated sequences. The two sequences found were Transposable Elements (TEs), and they were inserted in the 28S rDNA sequence.

## Discussion

The variation of cluster number for 45S rDNA or its genes is commonly found at interspecific level (Cabrero and Camacho 2008; Rocha et al 2011; Gournung 2013), or between distinct population of a species (Gu and Xiao 2003; Keller et al. 2006; Pedrosa-Harand 2006, Roa and Guerra 2012). Here we noticed extensive variability intraspecifically for *A. flavolineata* in six populations, but additionally we noticed a less common pattern, that is the occurrence of high variation at intrapopulation level. This high variability is supported by occurrence of distinct number of 18S rDNA clusters in individuals from the same population, besides the occurrence of signals with distinct sizes and the heteromorphic pairs, with presence/absence of clusters. It suggests also that for the same chromosomes distinct variants are present in the populations, but none pattern is fixed. This highly variation could be attributed to distinct molecular mechanisms that act in the origin and spreading of repetitive DNAs in Eukaryote genomes, like ectopic recombination, unequal crossing-over, gene conversion and transposable elements (Dover 1986; Montgomery et al. 1991; Charlesworth et al. 1994; Petrov et al. 2003, Nguyen et al. 2010). Moreover, the difference in cluster size for distinct chromosomes or heteromorphism support the idea that the 18S rDNA has been movement in the chromosomes of *A. flavolineata* with emergence of new clusters, in accordance with the “dispersion-amplification-deletion” model (Dubcovsky and Dvorák 1995).

Based in the number of copies for the distinct genes that compose the 45S rDNA, using sequenced genome data, it is supported the occurrence of high number of pseudogenes. The increase of number of pseudogenes could be related with the multiplication of number of clusters observed here. Moreover the distinct number of copies for 18S, 5.8S and 28S suggest that these the genes and their spacers have been movement in the genome independently each other.

There are some ways to explain the movement of 18S rDNA loci in the chromosomes of *A. flavolineata*, like macrochromosomal rearrangements, transposition events associated to TEs, or ectopic recombination, besides the occurrence of eccDNAs. As the karyotype observed in *A. flavolineata* is the ancestral for Acrididae, it is supposed that the chromosomes of this species were not rearranged, and the movement of 18S rDNA could not be explained in this way. Likewise, the transposons found in the 28S gene are non-Long Terminal Repeat-retrotransposons (Kapitonov et al. 2009) and they are not able to carry sequences (Han 2010).

This kind of TEs insert yourself on genome in specific regions and replicate like a retrovirus, so, they are not able to transport gene pieces. Although, we can not rule completely out the possibility of other TEs, not directly associated to the 45S rDNA, acting in the movement of the clusters. In other species the movement of ribosomal genes based in TEs were noticed, like in *Aegilops speltoides* Tausch were *En/Spm* transposons mediate the rDNA transfer in the chromosomes. It occurs in genomic-specific way and it was noticed in somatic and meiotic tissue (Raskina et al 2004). Our data support most parsimoniously that the dispersion could be attributed to the ectopic recombination process, in accordance with ‘dispersion-amplification-deletion’ mode (Dubcovsky and Dvorák 1995).

The Brazilian population from North, Southeast and Northeast and the population from Argentina are separated for a long distance and it indicates a possible isolation between them. Even with this long distance, there were found some conserved chromosomes presenting 18S rDNA signals in all the *A. flavolineata* populations. The 18S loci from the chromosomes 1, 3, 6 and 9 are apparently conserved once that they have always appeared in FISH. Although, the chromosome 9 has less heteromorphy then the others and also it shows NOR for all the individuals analyzed with silver staining. It strongly indicates that parsimoniously the chromosome 9 may be the ancestral loci for the 18S sequence, once it presents the same pattern for all six populations from our data and it is the active loci. Presence of active rDNA sites in the chromosome 9 was reported in some grasshopper species, like in seventeen species studied by Cabrero and Camacho (2008). This was also observed in one species from the same tribe that *A. flavolineata* (Abracrini), *Orthoscaphus rufipes* (Rocha et al. 2001). These data support the idea that the chromosome 9 could be the ancestral for the rDNA sequence in *A. flavolineata*.

In the silver staining also was found many cryptical loci, principally in chromosome 10, and also in chromosomes 4 and 5. The presence of many cryptical loci and silent loci is also according with ‘dispersion-amplification-deletion model’ (Dubcovsky and Dvorák 1995) and with Cabrero and Camacho (2008) studies. The abundance of those locus reveals that might be occurring a movement of few rDNA to a new chromosome location revealing a new NOR. The cryptic NORs may correspond a nascent NORs, whereas the silent loci can correspond to those that are in process of elimination.

### **Acknowledgements**

This study was supported by ‘Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo’ (FAPESP) and by ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico’ (CNPq).

## References

- Bueno, D.; Palacios-Gimenez, O. M.; Martí, D. A.; Mariguela, T. C.; Cabral-De-Mello, D. C. The 5S rDNA in two *Abracris* grasshoppers (Ommatolampidinae: Acrididae): molecular and chromosomal organization. *Molecular Genetics and Genomics*. v. 291, p. 1607-13, 2016, doi: 10.1007/s00438-016-1204-1
- Bueno, D.; Palacios-Gimenez, O.M.; Cabral-De-Mello, D.C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. doi:10.1371/journal.pone.0066532. *Plos One*, v. 8 2013
- Cabral-De-Mello, D.C.; Moura, R.C.; Martins, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DANN similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, v. 104, p. 393-400, 2010
- Cabrero, J.; Camacho, J.P.M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research*, v. 16, p. 595-607, 2008
- Cai, Q.; Zhang, D.M.; Liu, Z.L.; Wang, X.R. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany* v. 97, p. 715-722, 2006
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, p. 215-220, 1994.
- Datson, P.M.; Murray, B.G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research*, v. 14, p. 846-857, 2006
- Dover, G. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet*, v.2: p. 159–165, 1986
- Dubcovsky, J.; Dvorak, J. Ribosomal RNA multigene loci - Nomads of the Triticeae genomes. *Genetics*, v. 140, p. 1367-1377, 1995
- Eickbush, T.H.; Eickbush, D.G. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, v. 175, p. 477-485, 2007
- Eirín-López, J. M.; Rebordinos, L.; Rooney, A. P.; Rozas, J. The birth-and-death evolution of multigene families revisited. *Genome Dynamics*. V. 7, p. 170-96, 2012 doi: 10.1159/000337119
- Freire, R., Arias, A., Ínsua, A.M., Méndez, J., Eirín-López, J.M. Evolutionary Dynamics of the 5S rDNA Gene Family in the Mussel *Mytilus*: Mixed Effects of Birth-and-Death and Concerted Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v. 70, p. 413-426, 2010
- Gordon, A.; Hannon, G.J.; Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads preprocessing tools. Unpublished: [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)

Gornung, E.; Twenty Years of Physical Mapping of Major Ribosomal RNA Genes across the Teleosts: A Review of Research. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 141, p. 90-102, 2013. DOI: 10.1159/000354832

Gu, Z., & Xiao, H. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camellia reticulata* polyploid complex (Theaceae). *Plant Science*, v. 164, p. 279–285, 2003. DOI:10.1016/S0168-9452(02)00410-7

Han, J. S. Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mobile DNA*, 1–12, 2010. DOI: 10.1186/1759-8753-1-15

Kapitonov, V. V.; Tempel, S.; Jurka, J. Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. *Gene*, v. 448, p. 207–213, 2009. DOI:10.1016/j.gene.2009.07.019

Keller, I.; Chintauan-Marquier, I. C.; Veltsos, P.; Nichols, R. A. Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution. *Genetics*, v. 174, p. 863-874, 2006

Montgomery, E.A.; Huang, S.M.; Langley, C.H.; Judd, B.H. Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: genome structure and evolution. *Genetics*, v. 129, p. 1085–1098, 1991

Nei, M.; Rooney, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 121-152, 2005

Nguyen, P.; Sahara, K.; Yoshido, A.; Marec, F. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, v. 138. p. 343–354, 2010

Novak, P.; Neumann, P.; Pech, J.; Steinhaisl, J.; Macas, J. RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, v. 29, p. 792–793, 2013

Pedrosa-Harand, A.; De Almeida, C. C. S.; Mosiolek, M.; Blair, M. W.; Schweizer, D.; Guerra, M. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, p. 924–933, 2006. DOI: 10.1007/s00122-005-0196-8

Petrov, D.A.; Aminetzach, Y.T.; Davis, J.C.; Bensasson, D.; Hirsh A. E. Size Matters: non-LTR retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, v. 20, p. 880–892, 2003

Pinhal, D.; Yoshimura, T. S.; Araki, C.S.; Martins, C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *Evolutionary Biology*, v. 11, p. 1-14, 2011

Raskina, O.; Belyayev, A.; Nevo, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops*

speltoides Tausch. *Chromosome Research*, v. 12, p. 153-161, 2004

Raskina, O.; Belyayev, A.; Nevo, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Research*, v. 12, p. 153-161, 2004

Reed, K.M.; Phillips, R.B.; Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*) . *Chromosome Research*, v. 8, p. 5–16, 2000

Roa, F.; Guerra, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 225-237, 2012. DOI: 10.1186/1471-2148-12-225

Rocha, M. F.; Melo, N. F.; Souza, M. J. Comparative cytogenetic analysis of two grasshopper species of the tribe Abracrini (Ommatolampinae, Acrididae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, p. 214–219, 2011. DOI:10.1590/S1415-47572011000200008

Rooney, A. P. Mechanisms Underlying the Evolution and Maintenance of Functionally Heterogeneous 18S rRNA Genes in Apicomplexans. *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, p. 1704–1711, 2004

Rooney, A. P.; Ward, T. J. Evolution of a large ribosomal RNA multigene Family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 5084–5089, 2005

Rufas, J. S.; Gimenez-Abian, J.; Suja, J. A.; Garcia De La Vega, C. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. *Genome*, v 29, p. 706-712, 1987

Schubert, I. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae S-Lat) - inferences from the specificity of silver staining. *Plant Systematics and Evolution*, v. 144, p. 291-305, 1984

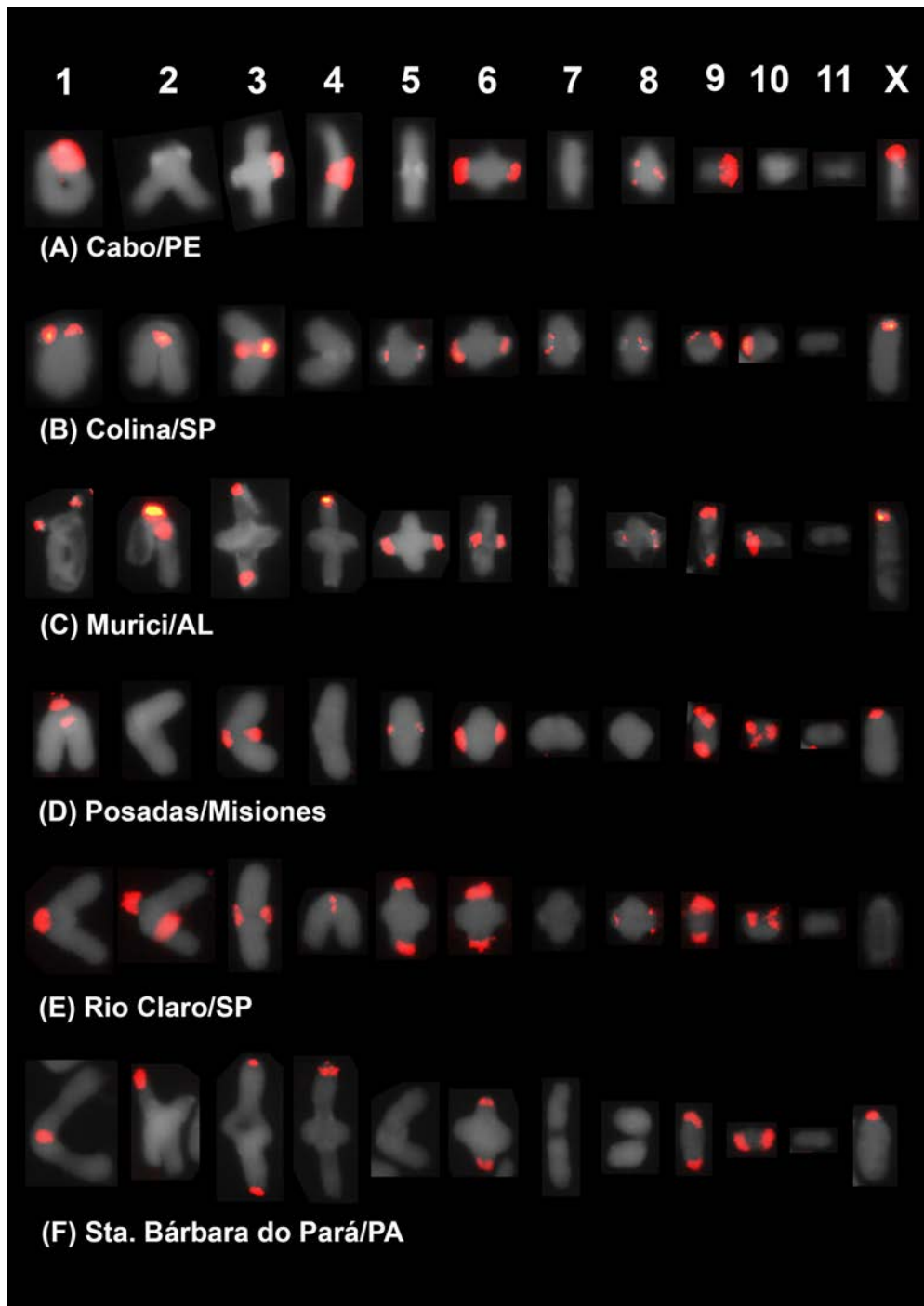
Schubert. I.; Wobus, U. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, v. 92, p. 143–148, 1985

Shishido, R.; Sano, Y.; Fukui, K. Ribosomal DNAs: na exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular General Genetics*, v. 263, p 586-591, 2000

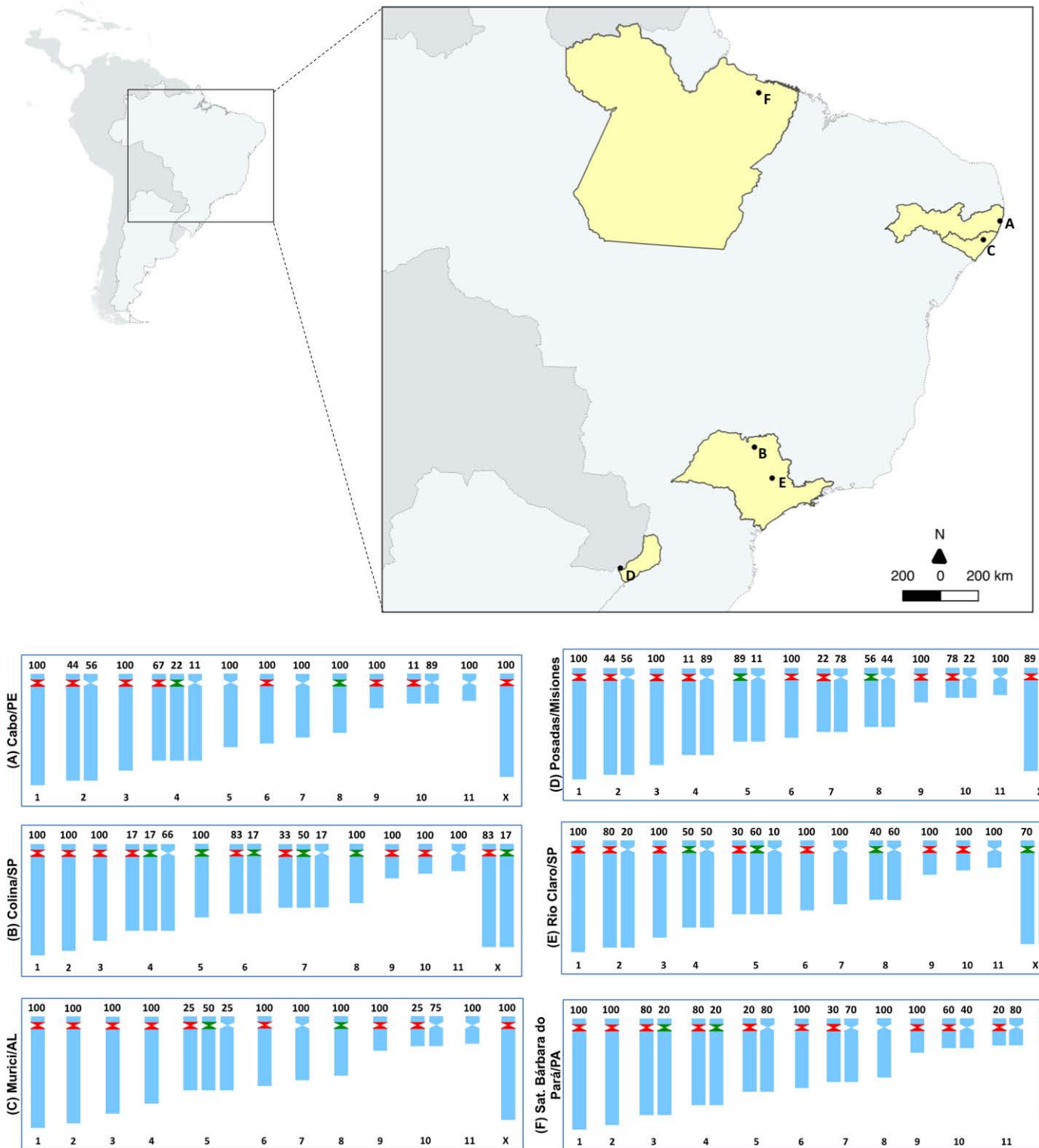
Sola, L.; Monaco, P.J.; Rasch, E.M.; Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* . I. Cbands, Ag-NOR polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 53, p. 148–154, 1990

Vierna, J.; González-Tizón, A. M.; Martínez-Lage, A. Long-Term Evolution of 5S Ribosomal DNA Seems to Be Driven by Birth-and-Death Processes and Selection in Ensis Razor Shells (Mollusca: Bivalvia). *Biochemical Genetics*, v. 47, p. 635–644, 2009. DOI: 10.1007/s10528-009-9255-1

## Figure captions

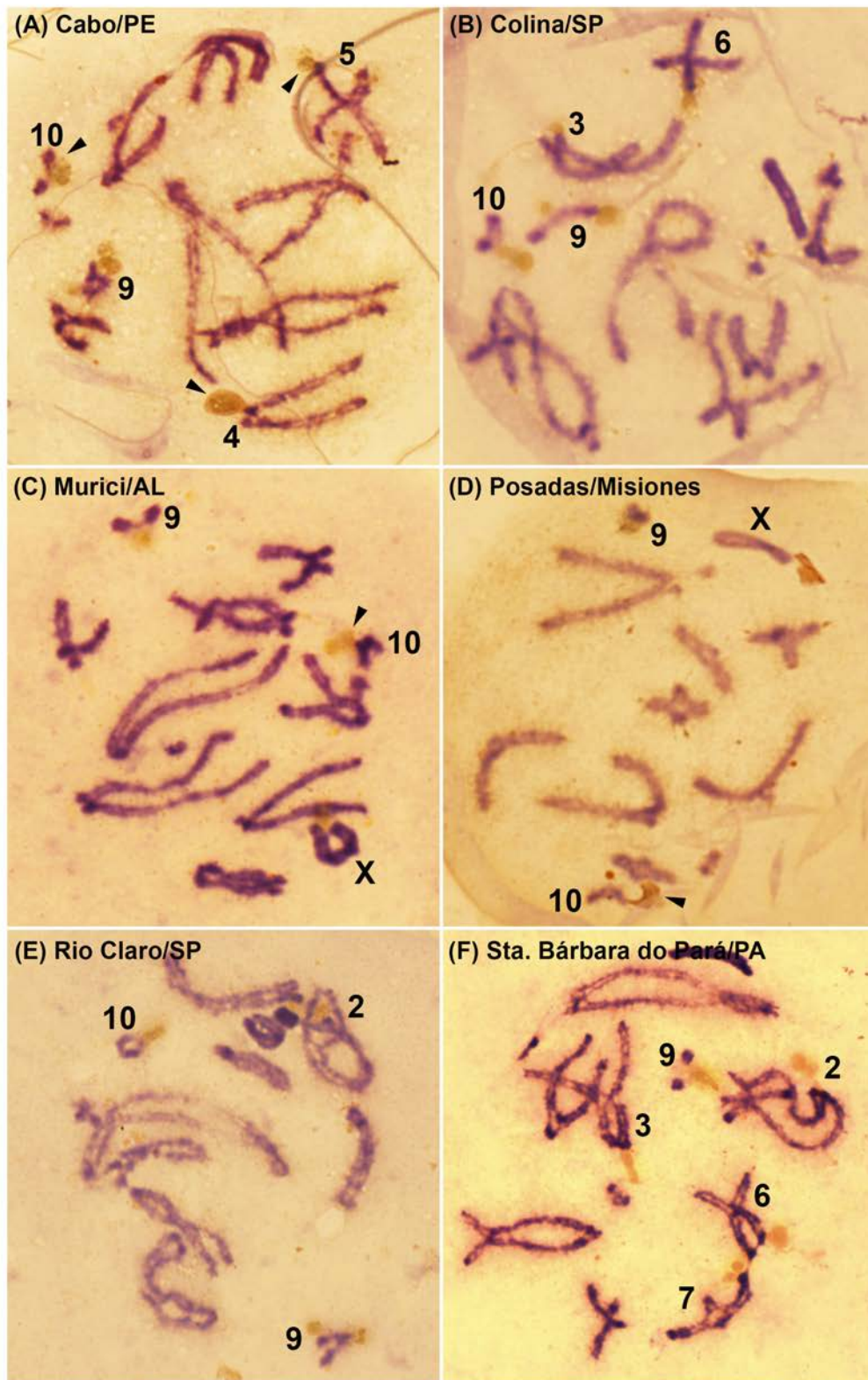


**Figure 1.** Chromosomal distribution of 18S rDNA in the chromosomes of *Abracris flavolineata* in individuals from distinct populations revealed through Fluorescent *in situ* hybridization. The autosomes were organized in decreasing order of size. Note the variability of cluster number and location. Each population are indicated directly in the figures.



**Figure 2.** Geographic distribution and representation of chromosomal distribution and size of 18S rDNA sites in the six studied populations of *Abracris flavolineata*. Red represents large signals and green represents small signals. The percentages for each situation are indicated above the chromosomes.





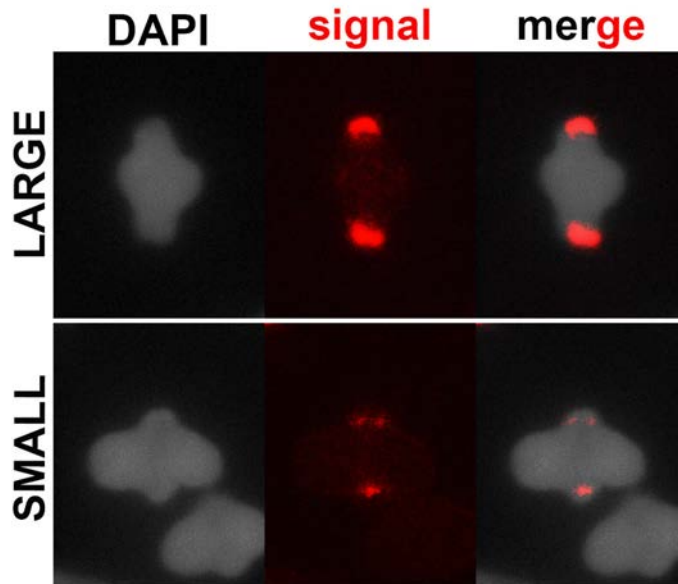
**Figure 3.** Silver nitrate staining in individuals from each population. The chromosomes harboring Nucleolar organizer regions are numbered and arrowheads represent criptic loci. The populations are indicated in each figure.





**Figure 4.** Reconstruction of the entire 45S rDNA cluster and the sequences associated in the genome of *Abracris flavolineata*. For each region the coverage of genome sequencing is presented above. Note the variability of coverage for distinct parts of 45S rDNA.

#### Supplementary files



**Supplementary file 1.** Difference between large and small sites for 18S rDNA in the chromosomes of *Abracris flavolineata*.

Population	Individual	Chromosomes												Total of labeled elements per haploid genome
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X	
Cabo/PE Brazil	G3094	L	-	L*	L	-	L	-	S	L*	-	-	L	7
	G3095	L*	L	L	L	-	L	-	S	L	L	-	L	9
	G3100	L*	L*	L*	L	-	L	-	S	L	-	-	L	8
	G3103	L*	L*	L	L	-	L	-	S	L	-	-	L	8
	G3104	L*	-	L*	L	-	L	-	S	L	-	-	L	7
	G3105	L*	-	L	-	-	L	-	S	L	-	-	L	6
	G3106	L*	L	L	S	-	L*	-	S	L	-	-	L	8
	G3108	L	-	L	L	-	L	-	S	L	-	-	L	7
	G3109	L	-	L	S*	-	L	-	S	L	-	-	L	7
Colina/SP Brazil	DC0104	L	L	L	-	S	L*	L	S	L	L	-	L	10
	DC0106	L	L	L	-	S	L	L*	S	L	L	-	L	10
	DC0107	L	L*	L	-	S	L	S*	S	L	L*	-	L	10
	DC0352	L	L*	L	L*	S	L	-	S	L	L*	-	L	10
	DC353	L	L	L	S*	S	S*	S*	S	L*	L*	-	L	11
	DC354	L	L*	L	-	S	L	S*	S	L	L	-	-	9
Murici/AL Brazil	65J16	L	L	L*	L*	-	L	-	S	L	-	-	L	8
	KXNPD	L	L	L	L*	L	L	-	S	L	L*	-	L	10
	QVH9U	L	L	L*	L*	S*	L	-	S	L	-	-	L	9
	YGN25	L*	L	L*	L*	S*	L*	-	S*	L	-	-	L	9
Posadas/ Misiones Argentina	DM5655	L	-	L	-	S	L	-	S	L	L*	-	L	8
	DM5656	L	-	L	-	-	L	-	S	L	L	-	S	7
	DM5657	L	L	L*	L	S	L*	-	S	L	-	-	L	9
	DM5658	L	L*	L	-	S	L	-	-	L	L	-	L	8
	DM5718	L	L*	L	-	S	L	L*	S	L	L	-	L	10
	DM5723	L	-	L	-	S	L	-	-	L	L	-	L	7
	DM5742	L	-	L	-	S	L*	L*	-	L	L*	-	L	8
	DM5743	L	L*	L*	-	S	L*	-	-	L	-	-	L	7
	DM5744	L	-	L	-	S	L*	-	S	L	L	-	L	8
Rio Claro/SP Brazil	DC0117	L	L	L	-	S	L	-	S	L*	L	-	-	8
	DC0195	L	L*	L	-	S	L	-	S	L	L	-	-	8
	DC0204	L	L*	L	S	S	L	-	-	L	L	-	S	9
	DC0206	L	L*	L	S	-	L	-	-	L	L*	-	S	8
	DC209	L	L*	L	S	L	L	-	-	L	L	-	S	9
	DC227	L	-	L	-	S	L	-	-	L	L	-	S	7
	DC228	L	L*	L	-	S	L*	-	S	L	L	-	S	9
	DC231	L	L*	L	S	L	L	-	S	L	L	-	-	9
	DC237	L	-	L	-	L	L	-	-	L	L	-	S	7
	DC238	L	L	L	S	S	L	-	-	L	L	-	S	9
Sta. Bárbara do Pará/ PA Brazil	G156	L*	L	S	S	-	L	-	-	L	L*	-	L	8
	G161	L	L*	L	L	-	L	-	-	L*	L*	-	L	8
	G166	L*	L	L	L	-	L	-	-	L	L*	L*	L	9
	G168	L	L	L*	L*	L	L	L*	-	L	-	-	L	9
	G170	L	L	L*	L	L*	L*	L	-	L*	-	-	L	9
	G185	L	L	L*	L*	-	L*	L*	-	L	-	-	L	8

L: Large signal, S: small signal, \* heteromorphic pair

**Supplementary file 2.** Location of 18S rDNA in individuals belonging to six populations of *Abracris flavolineata*.

Chromosome	Population						Total
	Cabo/PE	Colina/SP	Murici/AL	Posadas/ Misiones	Rio Claro/SP	Sta. Bárbara do Pará/PA	
1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	44,4	100,0	100,0	44,4	80,0	100,0	75,0
3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4	88,9	33,3	100,0	11,1	50,0	100,0	62,5
5	0,0	100,0	75,0	88,9	90,0	20,0	58,3
6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
7	0,0	83,3	0,0	22,2	0,0	30,0	20,8
8	100,0	100,0	100,0	55,6	40,0	0,0	58,3
9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	11,1	100,0	25,0	77,8	100,0	60,0	64,6
11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	4,2
X	100,0	83,3	100,0	100,0	70,0	100,0	91,7

**Supplementary file 3.** Frequency of 18S rDNA sites in distinct chromosomes of *Abracris flavolineata* for the six populations studied.