
Ciências Biológicas

ANA ELISA GASPAROTTO DA SILVA

**Estudo populacional do cromossomo B no
gafanhoto *Abracris flavolineata*: frequência e
composição molecular**



Rio Claro
2018

ANA ELISA GASPAROTTO DA SILVA

Estudo populacional do cromossomo B no gafanhoto *Abracris flavolineata*: frequência e composição molecular

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

Co-orientador: Me. Diogo Milani

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

Rio Claro
2018

S586e

Silva, Ana Elisa Gasparotto da

Estudo populacional do cromossomo B no gafanhoto *Abracris flavolineata*:
frequência e composição molecular / Ana Elisa Gasparotto da Silva. -- Rio
Claro, 2018

43 f. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

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

Orientador: Diogo C. Cabral-de-Mello

Coorientador: Diogo Milani

1. Cromossomos supranumerários. 2. DNAs repetitivos. 3. Citogenética. 4.
Evolução. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio
Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Ao meu pai, Luis Carlos, meu maior exemplo de dedicação, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos e não desistir nem um minuto do que eu almejava ser. À minha mãe Rosângela, meu porto seguro, que sempre esteve de braços abertos para me acalmar e confortar meus medos. Meus pais, eu tenho o mais profundo sentimento de gratidão por estarem todos os dias na minha vida, me mostrando carinho, amor, compreensão, por me guiarem e serem minha inspiração. A minha conquista devo a vocês por me darem asas e forças para buscar o meu melhor caminho.

Ao meu irmão Fernando, pelo apoio, por me aconselhar e estar do meu lado. Ao meu cachorrinho Toby, meu eterno companheiro, que em cada volta para casa estava me esperando feliz.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Doutor Diogo Cavalcante Cabral De Mello, por acreditar, confiar e incentivar a nossa pesquisa com cromossomo B em gafanhotinhos, por sempre estar disposto a me ensinar e estar de prontidão para resolver qualquer dificuldade minha. Agradeço por ser um grande exemplo de orientador, pesquisador, professor e amigo.

Agradeço ao meu co-orientador Dioguinho, pelas conversas, por estar presente em cada manhã preparando FISH e por me auxiliar na pesquisa. Agradeço aos amigos do grupo GECEA, que fizeram os dias de laboratório tornarem-se mais leves e divertidos. E especialmente, a minha amiga Ana Beatriz, por me acolher e me ajudar nessa caminhada.

Agradeço aos amigos que conquistei nessa jornada e se tornaram minha família em Rio Claro. As minhas irmãs de alma, Mileni e Melissa, por estarem tão presentes nos meus dias e dividirem tantos sorrisos. É difícil escrever o tanto que vocês são importantes em minha vida, e hoje é apenas um capítulo que termina, mas teremos muitos outros momentos para compartilharmos juntas, estarei sempre aqui com e por vocês. Agradeço ao Guilherme, Leonardo e Samantha, por todos os trabalhos divididos, pelas conversas, risadas e por serem meus melhores amigos. Gratidão por terem vocês nos meus dias.

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsible to change”
- *Charles Darwin* -

Resumo

Elementos adicionais e parasitas conhecidos como cromossomos B tem sido descrito em aproximadamente 15% das espécies eucarióticas. Eles possuem características primárias que definem sua origem, composição, meios de acumulação e evolução, como por exemplo, os modos irregulares de herança, incapacidade de pareamento com os cromossomos do complemento A durante a meiose e acumulação de distintos DNAs repetitivos. Neste trabalho, analisamos a frequência e possível presença de cromossomo B e sua composição molecular, através de técnicas como Banda-C e mapeamento por Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), em diferentes populações do gafanhoto *Abracris flavolineata*. As distintas populações analisadas revelaram ocorrência de um cromossomo B, exceto em Sta. Bárbara/PA. Nenhuma das populações apresentou indivíduos com dois cromossomos B, como relatado em Rio Claro/SP, sugerindo diferenças de acumulação e transmissão. As análises por Banda-C mostraram regiões com padrão C-positivo para a população da Argentina, indicando a natureza heterocromática do seu cromossomo B. As demais populações revelaram um padrão C-negativo para o B, similar a população de Rio Claro/SP, indicando uma aproximação de composição deste elemento nessas populações. O mapeamento por FISH revelou compartilhamento de sinal do gene U2 snDNA entre o cromossomo B e o maior par autossômico, com exceção da Argentina, reforçando a possível origem deste elemento a partir do par 1 do complemento A. O elemento transponível Afl_Jockey-5 mostrou um sutil sinal proximal no B da Argentina, enquanto para as outras populações, apresentou blocos em ambas extremidades dos braços. O Afl_Gypsy-12 mostrou sinal nas regiões eucromáticas do B das distintas populações, exceto na Argentina. O DNA satélite AflSat_1 revelou sinal por todo cromossomo B das distintas populações. O AflSat_134 apresentou padrão de blocos centromérico e telomérico para o cromossomo B, excepcionalmente a população da Argentina revelou marcas por toda sua extensão. As análises puderam elucidar questões sobre as diferentes taxas de acumulação, evolução e composição, além de uma possível nova variante deste elemento supranumerário no gafanhoto *Abracris flavolineata*.

Palavras-chave: cromossomos supranumerários, DNAs repetitivos, citogenética, evolução.

SUMÁRIO

1. Introdução	6
1.1. DNAs repetitivos	7
1.2. Elementos supranumerários em gafanhoto	9
2. Objetivos	14
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Isolamento de DNAs repetitivos	17
3.2. Ensaios citogenéticos	18
4. Resultados	19
5. Discussão	28
6. Considerações Finais	32
7. Referências Bibliográficas	34

Introdução

1.1. DNAs repetitivos

Os genomas eucarióticos apresentam ampla variabilidade por serem compostos de diferentes quantidades de DNAs repetitivos. Esses elementos representam famílias de diferentes classes com variável grau de repetição, encontrando-se organizadas *in tandem* ou dispersas pelo genoma. Dentre as sequências repetitivas estão incluídos os DNAs satélites (satDNA, microssatélites e minissatélites), famílias multigênicas e os elementos de transposição (transposons e retrotransposons) (CHARLESWORTH *et al.* 1994; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012). Estas sequências repetitivas, essencialmente as famílias multigênicas, estão envolvidas na codificação de importantes proteínas e RNAs que atuam na organização e metabolismo celular, além de estarem envolvidas na organização e funcionalidade dos centrômeros, telômeros, segregação cromossômica, reparo e replicação do DNA, e diferenciação dos cromossomos sexuais (ANLEITNER e HAYMER 1992; KRAEMER e SCHMIDT 1993; MESSIER *et al.* 1996; MARTINS 2007; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012). Adicionalmente, os DNAs repetitivos estão envolvidos na formação de heterocromatina e em processos de regulação gênica (SHAPIRO e STERNBERG 2005; BIÉMONT e VIEIRA 2006; FESCHOTTE e PRITHAM 2007).

Os DNAs satélites são sequências altamente repetitivas com grande variabilidade, estando organizadas *in tandem* com diferentes números de cópias nos genomas eucarióticos, podendo variar entre 1.000 e mais de 100.000 cópias de uma unidade de repetição, geralmente com 100-300 pb (pares de bases). Essas sequências repetitivas estão organizadas em extensos aglomerados, principalmente nas regiões centromérica e telomérica dos cromossomos, sendo o principal componente da heterocromatina (JOHN e MIKLOS 1979; CHARLESWORTH *et al.* 1994; UGARKOVÍČ e PLOHL 2002; PALOMEQUE e LORITE 2008). Além disso, os DNAs satélites compreendem um dos componentes mais dinâmicos do genoma, sofrendo rápidas mudanças na composição de arranjos e sequências em um curto período de evolução. A expansão e encolhimento de satDNAs contribuem significativamente para o polimorfismo (GARRIDO-RAMOS 2015; PLOHL *et al.* 2014). Adicionalmente, a rápida evolução destas sequências repetitivas pode causar barreiras reprodutivas entre os organismos, promovendo a especiação (PLOHL *et al.* 2014; FELICIELLO *et al.* 2014; MALIK e HENIKOFF 2009).

Os DNAs satélites apresentam papel funcional na regulação de genes e genomas, além de formar o locus do centrômero e a heterocromatina da área pericentromérica. Outras funções também são sugeridas a estas sequências como organização cromossômica, pareamento e segregação (PLOHL *et al.* 2008; PLOHL *et al.* 2014). Além disso, os transcritos de DNAs satélites podem estar envolvidos no controle de alongamento de telômeros, na resposta ao estresse e na regulação epigenética do estabelecimento e manutenção da heterocromatina e na modulação gênica (PEZER *et al.* 2012; BISCOTTI *et al.* 2015; GRENFELL *et al.* 2017). Diferentes famílias de DNAs satélites podem estar presentes em uma espécie, por exemplo, existem até 15 famílias em *Pisum sativum* (MACAS *et al.* 2007), 62 famílias em *Locusta migratoria* (RUIZ-RUANO *et al.* 2016), ou 9 famílias dentro do genoma humano (LEVY *et al.* 2007; MIGA 2015). No entanto, há geralmente uma ou algumas famílias predominantes de DNA satélite em cada espécie (MACAS *et al.* 2007; RUIZ-RUANO *et al.* 2016; LEVY *et al.* 2007; MIGA 2015; MESTROVIC *et al.* 1998; MRAVINAC *et al.* 2002; MRAVINAC *et al.* 2005).

As famílias multigênicas representam um grupo de genes que descende de um genoma ancestral comum e, portanto, possuem sequências de DNA, com notável similaridade estrutural e funcional (NEI e ROONEY 2005). Estas sequências podem ocorrer em múltiplas cópias no genoma, e dentre as mais analisadas em estudos cromossômicos são os genes de RNAs ribossomais (RNAr), snRNA (*small nuclear RNA*) e genes codificadores de proteínas histônicas. A evolução combinada é uma forma de evolução da família multigênica, na qual todos os genes são considerados como um conjunto e uma mutação ocorrendo em uma repetição se espalham através dos genes membros inteiros por ocorrência repetida de cruzamento desigual ou conversão gênica. Outra forma de evolução multigênica é a evolução do nascimento e morte, a qual novos genes duplicados são mantidos no genoma por um longo tempo, enquanto outros são deletados ou inativos por mutações deletérias (NEY e ROONEY 2005). Estudo com evolução combinada de genes U2 snRNA em primatas mostraram que as regiões codificantes deste gene são muito semelhantes entre si, mas as regiões intergênicas são heterogêneas dentro de cada espécie (LIAO *et al.* 1998; PAVELITZ *et al.* 1999).

Os elementos transponíveis diferem-se das outras sequências repetitivas presentes nos genomas eucariotos pela sua capacidade de transposição/movimentação para distintas regiões, originando novas cópias de si mesmo (BIÉMONT e VIEIRA

2006; FESCHOTTE e PRITHAM 2007; WICKER *et al.* 2007). O comportamento replicativo de TEs (elementos de transposição) propicia o acúmulo destes elementos no genoma, no qual são considerados como parasitas genômicos ou DNA egoísta. Porém, sua contribuição para o tamanho do genoma, no processo evolutivo de outras sequências repetitivas e sua capacidade de mutação gênica e cromossômica, os tornou fundamentais na construção e organização genômica dos eucariotos (KIDWELL 2002; FESCHOTTE e PRITHAM 2007). A prevalência de longo prazo destes elementos transponíveis nas populações pode ser justificada pelo equilíbrio entre a habilidade de auto-propagação e a eliminação da cópia gerada pelos efeitos deletérios associados à inativação dos genes onde eles se encontram, como também nas consequências negativas da recombinação ectópica e rearranjos cromossômicos que eles promovem (CHARLESWORTH *et al.* 1994; KIDWELL e LISH 1997).

1.2. Elementos supranumerários em gafanhoto

Os cromossomos B, também conhecidos como elementos supranumerários, são considerados como um parasita genômico possível de ser analisado em nível citológico, e está descrito em aproximadamente 15% das espécies eucarióticas (CAMACHO 2005). Esses elementos supranumerários possuem características primárias que definem sua origem, composição, formas de acumulação e evolução, tais como modos irregulares de herança, incapacidade de emparelhamento com os cromossomos A durante a meiose (CAMACHO *et al.* 2000). Os cromossomos B caracterizam-se por apresentar mecanismos de acumulação, mitóticos e/ou meióticos, devido principalmente à segregação não mendeliana e se transmitirem com taxas superiores às dos cromossomos A (JONES 1995; HOUBEN *et al.* 2013).

Na maioria dos casos, sua origem provavelmente teve início a partir da hibridação dos cromossomos A de uma mesma espécie com a de uma espécie aparentada sugerindo uma hipótese intraespecífica. Esta hipótese é apoiada pela existência de sequências de DNA que aparecem nos cromossomos A, que estão também contidas nos cromossomos B (CAMACHO 2005).

Desde sua descoberta foram propostos diferentes modelos para explicar a conservação dos cromossomos B nas populações. Segundo Camacho *et al.* (2000), o que se encontra na maioria dos cromossomos B estudados seria o modelo parasita-egoísta (ÖSTERGREN 1945; JONES 1995; SHAW e HEWITT 1990), o qual considera

que a atual frequência de cromossomos B é o produto de um equilíbrio entre os mecanismos de acumulação, que aumentam a frequência e o impacto negativo destes cromossomos sobre a eficiência biológica em portadores, que diminuem a sua frequência. Sugerindo assim que o genoma do hospedeiro pode mostrar diferentes níveis de tolerância, podendo ser visto como um genótipo exposto a diferentes graus de parasitismo (número de cromossomos B) (CAMACHO 2003). Um genótipo considerado tolerante poderia ser capaz de portar cromossomos B com uma redução da eficiência biológica menor que a dos indivíduos não tolerantes. Devido ao cromossomo B ser mais ou menos estável, podendo-se evoluir através de várias alternativas, extinguindo-se por deriva ou seleção, continuando a ser um parasita, ou integrar-se no genoma sem adquirir nenhuma função (CAMACHO 2005). Assim, por esses cromossomos B não recombinarem com os cromossomos do complemento A, podem estar presentes exibindo diferentes números em alguns indivíduos em determinada população de uma espécie, seguindo seu próprio caminho evolutivo, através da acumulação de mutações exclusivas e ocorrência de distintas sequências (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO 2005; HOUBEN *et al.* 2014; VALENTE *et al.* 2016; TRIFONOV *et al.* 2013). A quantidade de cromossomo B nas diferentes populações depende, além da tolerância da espécie para os mesmos, dos seus mecanismos e taxa de acumulação, intensidade de efeitos deletérios, deriva genética, e número de gerações transcorridas desde o seu aparecimento (VOLOBUJEV e TIMINA 1980).

Os cromossomos B podem apresentar tamanho equivalente ao dos cromossomos do complemento A, porém existem exemplos de cromossomos B maiores que os A, como também menores, a exemplo dos mini-cromossomos B descritos em várias espécies. O tamanho dos cromossomos B interfere diretamente em sua estabilidade ao longo das divisões celulares, sendo os grandes ou de tamanhos medianos mais estáveis comparados aos Bs diminutos (CAMACHO 2005). Em relação a composição dos cromossomos B, a maioria é composta de elementos repetitivos ou heterocromáticos. Distintas classes de DNAs repetitivos foram encontradas, evidenciando que grande parte da composição desses elementos são formadas a partir de sequências repetitivas, como DNAs satélites, elementos transponíveis e as famílias multigênicas, que incluem os DNAr 18S, 5S, DNAsn U2 e genes histonas (BUENO *et al.* 2013; CABRAL-DE-MELLO *et al.* 2010; CAMACHO 2005).

Os elementos repetitivos mais encontrados nos cromossomos B são os genes ribossomais, DNAs satélites e elementos transponíveis (CAMACHO *et al.* 2000; CAMACHO 2005), sendo esses descritos em diversos cromossomos B de diferentes espécies, tais como *Crepis capillaris* (Asteraceae), *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera), *Drosophila subsilvestris* (Diptera), *Zea mays* (Poaceae), *Secale cereale* (Poaceae), *Astyanax scabripinnis* (Osteichthyes), dentre outros, podendo os mesmos serem específicos dos Bs ou compartilhados com cromossomos do complemento A (NUR *et al.* 1988; JAMILENA *et al.* 1994; GUTKNECHT *et al.* 1995; PUERTAS 2002; LÓPEZ-LEÓN *et al.* 2008; MARQUES *et al.* 2012). Nas espécies *Z. mays* e em *S. cereale*, os cromossomos B compartilham sequências de DNA repetitivos com os cromossomos A, como também são observadas outras sequências de DNA satélites específicos dos cromossomos B (PUERTAS 2002).

Análises baseada na quantidade de dois tipos de DNAs repetitivos, um ribossomal (rDNA) e um satélite (satDNA), no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* revelaram quatro variantes de cromossomos B, mostrando para o B1 uma quantidade igual ou maior de rDNA que o satDNA, enquanto as outras 3 variantes apresentaram uma quantidade maior de satDNA do que de rDNA (CABRERO *et al.* 2014).

O acúmulo de sequências repetitivas nos cromossomos B está associada diretamente com a sua natureza heterocromática e ausência de recombinação com os cromossomos A (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO *et al.* 2000). Entretanto, os DNAs repetitivos possuem grande influência na formação dos cromossomos B (GREEN 1999), sequências repetitivas localizadas próximas ao centrômero poderiam trazer vantagens para a diferenciação dos cromossomos B, como alteração nas formas de impulso meiótico (*meiotic drive*) e taxas de não-disjunção (HENIKOFF e MALIK 2002). Além disso, a proliferação de DNAs repetitivos promovendo maior capacidade de transferência de DNA para os cromossomos B de espécies com genomas maiores poderia estar relacionado ao seu enorme tamanho genômico, como por exemplo os gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* e *Locusta migratoria* que apresentam 10.16 Gb e 6.3Gb, respectivamente (RUIZ-RUANO *et al.* 2011; WANG *et al.* 2014).

Na ordem Orthoptera, a presença de cromossomos B foi relatada em 191 espécies das 1.601 estudadas do ponto de vista citogenético até o momento, sendo prevalentes em espécies com cromossomos acrocêntricos. Para este grupo algumas superfamílias são consideradas “*hot spots*” para a presença de cromossomos B, entre as quais destaca-se Acridoidea, com cerca de 14,6% das espécies já estudadas

apresentando este polimorfismo (PALESTIS *et al.* 2010). Neste grupo, apesar de muitos estudos se restringirem a análises citogenéticas clássicas, há exemplos de estudos mais aprofundados. Em *Eyprepocnemis plorans*, por exemplo, foi realizado o mapeamento cromossômico através da hibridização *in situ* fluorescente (ver, por exemplo, CABRERO *et al.* 2003; ABDELAZIZ *et al.* 2007; LÓPEZ-LEÓN *et al.* 2008). Nessa espécie os cromossomos B apresentam comportamento mitótico estável (ou seja, todas as células dos indivíduos apresentam o cromossomo B) e mais de 50 variantes do mesmo foram observadas em diferentes populações (BAKKALI 2001; LÓPEZ-LEÓN *et al.* 2008). Por exemplo, o mapeamento dos genes ribossomais e do DNAsat 180-pb indicam a origem múltipla e independente do cromossomo B em populações europeias (CABRERO *et al.* 2003). Além disso, o mapeamento do rDNA 5S indica a origem do cromossomo supranumerário a partir do menor elemento autossômico (S11) na população do Caucaso (CABRERO *et al.* 2003), enquanto em outras populações sua origem a partir do cromossomo X foi relatada com o uso de sondas de rDNA 45S e satDNA (180-pb) (LÓPEZ-LEÓN *et al.* 1994). Outro exemplo de gafanhoto estudado é a espécie *Locusta migratoria*, o mapeamento físico cromossômico de DNAs repetitivos realizados demonstrou que sequências de genes ribossomais 45S e 5S não estavam presentes nos cromossomos B, no entanto, sequências de genes de histonas H3 e H4 mostraram-se presentes, o que sugere a origem deste elemento a partir do par cromossômico 8 da espécie, também portador do cluster de histona (TERUEL *et al.* 2010).

Entre as espécies sul-americanas melhores estudadas com relação à composição do cromossomo B, encontram-se como exemplos *Rhammatocerus brasiliensis*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Dichroplus pratensis*, *Eumastusia koebelei koebelei* e *Abracris flavolineata* (ANJOS *et al.* 2016; BIDAU *et al.* 2004; BUENO *et al.* 2013; LORETO *et al.* 2008). Na espécie *R. brasiliensis*, estudos mostraram que o cromossomo B possui semelhança com alguns autossomos portadores de DNAr 5S, mas não DNAr 45S, e também revelaram que o cromossomo X não apresenta ambas as famílias de DNAr (LORETO *et al.* 2008), indicando origem autossômica. Além da dispersão do DNAr 5S no genoma, foram também verificados múltiplos locais de genes H3 de histonas, ocorrendo nas mesmas regiões cromossômicas de DNAr 5S, como também no cromossomo B (OLIVEIRA *et al.* 2011). Para a espécie *Dichroplus pratensis* foram registrados três tipos distintos de cromossomos B (BIDAU 1987), dos quais um deles

apresenta DNAs ribossomais compartilhados com o par cromossômico 8 localizados em uma região muito próxima, indicando ancestralidade (BIDAU *et al.* 2004).

Em *Xyleus discoideus angulatus* foi observada a variação de três tipos de cromossomos B, com o uso de cromossomo B microdissecado como sonda. O cromossomo B1 revelou sinais distribuídos por todo cromossomo, B2 indicou sinais mais evidentes nas regiões pericentromérica e distal do cromossomo B e o B3 revelou sinais distintos na metade distal do braço longo do cromossomo, estas variações sugerem que o cromossomo B ancestral de *X. d. angulatus* provavelmente sofreu amplificação e deleção de sequências e rearranjos, como inversões, que contribuíram para o surgimento de diferentes morfotipos (BERNARDINO *et al.* 2017).

A espécie sul-americana de gafanhoto *Abracris flavolineata*, apresenta o cariótipo $2n = 23$, X0 (macho) e $2n = 24$, XX (fêmea) com presença de um ou dois cromossomos B submetacêntricos, como reportado, exclusivamente, na população de Rio Claro/SP, variando temporalmente a frequência entre 13.5% e 31.5% nos machos (MILANI *et al.* 2017). A origem do cromossomo B nesta espécie é indicada a partir do par cromossômico 1 portador de sítios de DNAsn U2, que também ocorre em múltiplas cópias no B (BUENO *et al.* 2013). Além do gene de DNAsn U2, o cromossomo B de *A. flavolineata* está enriquecido de distintos microssatélites (MILANI *et al.* 2014), um DNA satélite centromérico (MILANI *et al.* 2017) e dois elementos transponíveis similares a *Mariner*, sendo que um encontra-se distribuído por todo o cromossomo, enquanto o outro concentra-se no braço longo (PALACIOS-GIMENEZ *et al.* 2014).

Apesar de estudos sobre cromossomos B em ortópteros serem numerosos, ainda há escassez em trabalhos relacionados com mapeamento físico cromossômico que visam elucidar os distintos padrões de origem e diversificação desses elementos supranumerários, principalmente com enfoque em gafanhotos sul-americanos. As análises populacionais propostas neste projeto, com auxílio de mapeamento físico cromossômico com distintas classes de DNA repetitivos são importantes para os estudos de evolução cromossômica, composição genômica, origem e também na análise espacial dos cromossomos supranumerários em gafanhotos.

Objetivos

2.1. Geral

Verificar a frequência e possível presença de cromossomos B e novas variantes, em distintas populações do gafanhoto *Abracris flavolineata*.

2.2. Específicos

- Verificar a presença, prevalência e frequência de cromossomos B em distintas populações de *Abracris flavolineata*, como Posadas/Misiones/Argentina, Santa Bárbara do Pará/PA, Santa Izabel/PA, Ananindeua/PA, Cabo/PE e comparar esses dados à população de Rio Claro/SP;
 - Amplificar por PCR e realizar o mapeamento citogenético de diferentes sequências de DNA repetitivos, incluindo DNAs satélites (AflSat_1, AflSat_134), família multigênica (gene U2 snDNA) e elementos transponíveis (Afl_Gypsy-12 e Afl_Jockey-5);
 - Utilizar os marcadores de DNAs repetitivos obtidos a partir da população de Rio Claro/SP em experimentos de FISH, a fim de verificar possíveis variantes do cromossomo B, auxiliando no entendimento da sua dinâmica evolutiva espacial.
-

Material e Métodos

Espécimes machos adultos e todo o material obtido de *Abracris flavolineata* coletados nas regiões de Posadas/Misiones/ARG (Argentina) 27°25' S, 55°56' O (14 indivíduos); Santa Bárbara do Pará/PA (Pará) 1°13'27'' S, 48°17'38'' O (76 indivíduos); Santa Izabel/PA (Pará) 1°17'55'' S, 48°09'38'' O (22 indivíduos), Ananindeua/PA (Pará) 1°21'57'' S, 48°22'19'' O (14 indivíduos), Cabo/PE (Pernambuco) 8°17'15'' S, 35°2'7'' O (19 indivíduos) e Rio Claro/SP (São Paulo) 22°24'45'' S, 47°31'28'' O (37 indivíduos), foram utilizados nas análises. Os folículos testiculares foram fixados em solução Carnoy modificada (3:1, Etanol:Ácido acético) para as análises cromossômicas. Os indivíduos inteiros de Rio Claro/SP foram armazenados em etanol 100% para extração de DNA, onde tiveram os tecidos extraídos através do kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega). As lâminas foram obtidas a partir da técnica clássica de espalhamento e coradas com Giemsa 5% para análises convencionais de presença de Bs em células de meiose obtidas de exemplares das diferentes populações. Posteriormente, células foram utilizadas para experimentos de Banda C de acordo com Summer (1972) e FISH. Pelo menos 15 metáfases, de cada indivíduo, foram analisadas para descrever os padrões de distribuição cromossômica das sequências repetitivas isoladas.

3.1. Isolamento de DNAs repetitivos

O DNAs genômicos de indivíduos de Rio Claro/SP foram utilizados como molde para amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) com primers previamente desenhados de distintas sequências de DNAs repetitivos, incluindo U2 snDNA (pequeno DNA nuclear) (Bueno et al., 2013), DNAs satélites AflSat_1 e AflSat_134 e elementos transponíveis Afl_Gypsy-12 e Afl_Jockey-5 (Milani *et al.*, em preparação).

Em seguida as amostras de PCR foram fracionadas através de eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação de bandas que foram purificadas pelo kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., The Epigenetics Company, USA) de acordo com as recomendações dos fabricantes, e reamplificadas por PCR para posterior uso como sondas para hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

As condições da reação de PCR partiram de uma desnaturação do DNA inicial à 94°C por 5 min., seguido por 30 ciclos à 94 °C por 30s, 53°C-60 °C por 30s e 72°C por 5 min.

3.2. Ensaios citogenéticos

Os fragmentos de PCR obtidos dos diferentes DNAs repetitivos foram marcados com Biotina 11-dUTP (Invitrogen) ou Digoxigenina 11-dUTP (Roche) através da Nick translation ou PCR. A FISH seguiu basicamente o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1988), com adaptações propostas por Cabral-de-Mello *et al.* (2010) e as sondas foram detectadas usando anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) ou alexafluor-488 (Life Technologies). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole) e montadas com meio de montagem VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA). As imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital refrigerada DP70 acoplada a um microscópio Olympus BX51 equipado com uma lâmpada de fluorescência e filtros apropriados e posteriormente pseudocoloridas e otimizadas com brilho e contraste pelo programa Adobe Photoshop CS6.

Resultados

A frequência de cromossomo B em machos de *Abracris flavolineata* das distintas populações analisadas revelou ocorrência em todas as populações, exceto na população de Santa Bárbara do Pará/PA que nenhum indivíduo apresentou cromossomo B. Nenhuma das populações apresentou indivíduos com dois cromossomos B, como relatado em Rio Claro/SP, sugerindo diferenças de acumulação e transmissão (Tabela 1).

As regiões cromossômicas C-positivas, que correspondem à heterocromatina constitutiva, foi observado em regiões pericentroméricas que se estendem aos braços curtos dos cromossomos do complemento A. O cromossomo B nas distintas populações foi C-negativo, como descrito por Bueno *et al.* (2013), destacando-se a população da Argentina que apresentou o cromossomo B heterocromático, com padrão C-positivo (Figura 1).

Tabela 1. Prevalência de cromossomo B em indivíduos machos de *Abracris flavolineata*.

População	Indivíduos (n)				Frequência
	0B	1B	2B	Total	
Posadas/Misiones/ARG	13	1	0	14	7.14%
Cabo/PE	15	4	0	19	21.05%
Santa Izabel/PA	21	1	0	22	4.54%
Santa Bárbara do Pará/PA	76	0	0	76	0.0%
Ananindeua/PA	12	2	0	14	14.28%
Rio Claro/SP	32	4	1	37	13.5%

0B, sem cromossomo B; 1B, 1 cromossomo B; 2B, 2 cromossomos B.

O mapeamento por FISH revelou presença de sinais do gene U2 snDNA no cromossomo B e no maior par cromossômico do complemento A (par 1) em todas as populações analisadas, com exceção da população da Argentina que apresentou sinal apenas no par 1 (Figura 2; Tabela 2). O DNA satélite AflSat_1 apresentou sinais

centroméricos em todos os pares do complemento A e um sinal pequeno centromérico no cromossomo B da população de Rio Claro/SP. No entanto, para as demais populações, o sinal desse satélite se estende por todo o cromossomo B, sendo mais evidente para a população de Posadas/ARG. O AflSat_134 revelou sinal proximal para todos cromossomos do complemento A, com exceção dos pares 9 e 11 para todas as populações, exceto para Cabo/PE que apresentou somente sinal intersticial no par 5 e proximal no par 8. Todas as populações apresentaram o mesmo padrão de blocos centromérico e teloméricos para o cromossomo B, excepcionalmente a população de Posadas/ARG apresentando marcas por toda sua extensão (Figura 2; Tabela 2).

O elemento transponível Afl_Gypsy-12 revelou sinais fracos e espalhados em todos os cromossomos do complemento A de Rio Claro/SP. Para as outras populações os sinais espalhados tornaram-se menos evidentes, mostrando uma maior amplificação no genoma de Rio Claro/SP (Figura 2). Em relação aos cromossomos B, Afl_Gypsy-12 apresentou um sinal em todas as populações, exceto para a população da Argentina. Já para o elemento transponível Afl_Jockey5, os sinais não clusterizados no complemento A de todas as populações mostraram-se bem menos amplificados, revelando apenas blocos em ambas extremidades dos braços do cromossomo B das diferentes populações analisadas, com exceção a população de Posadas/ARG que mostrou um pequeno sinal proximal (Figura 2).

Figura 1. Bandas-C em células de meiose de indivíduos machos de *Abracris flavolineata* em diferentes populações.

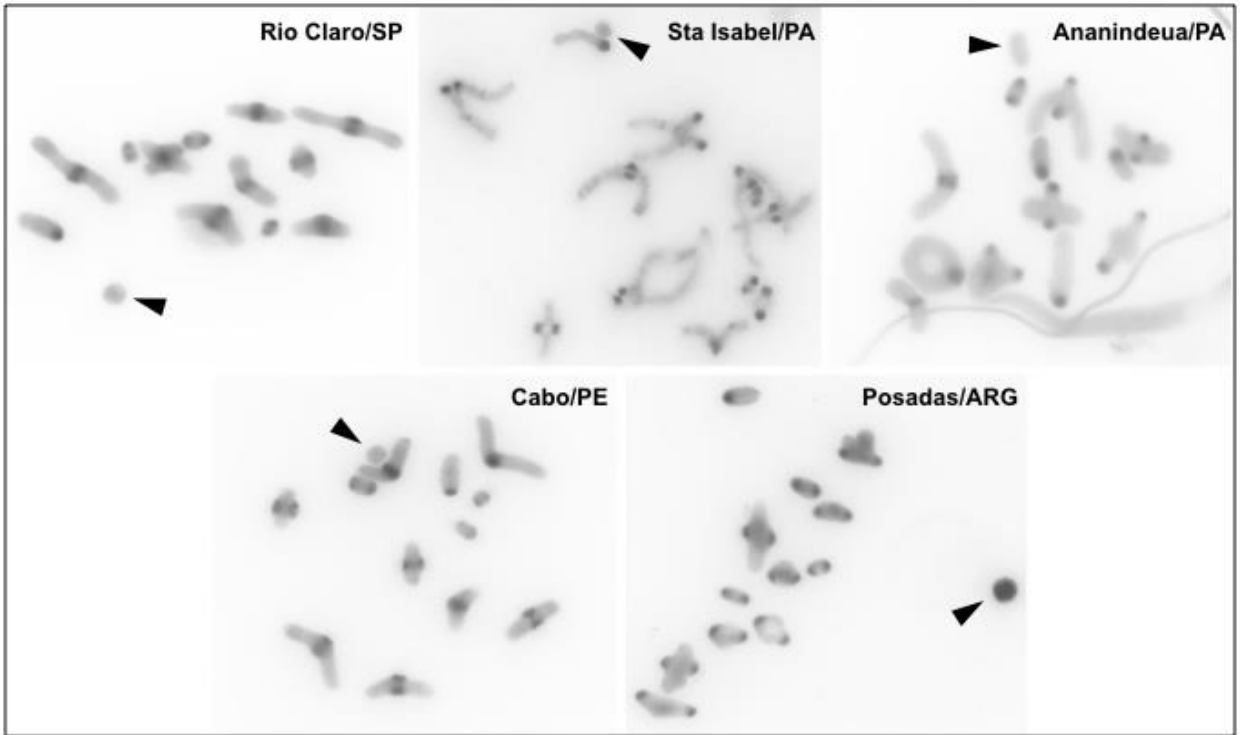
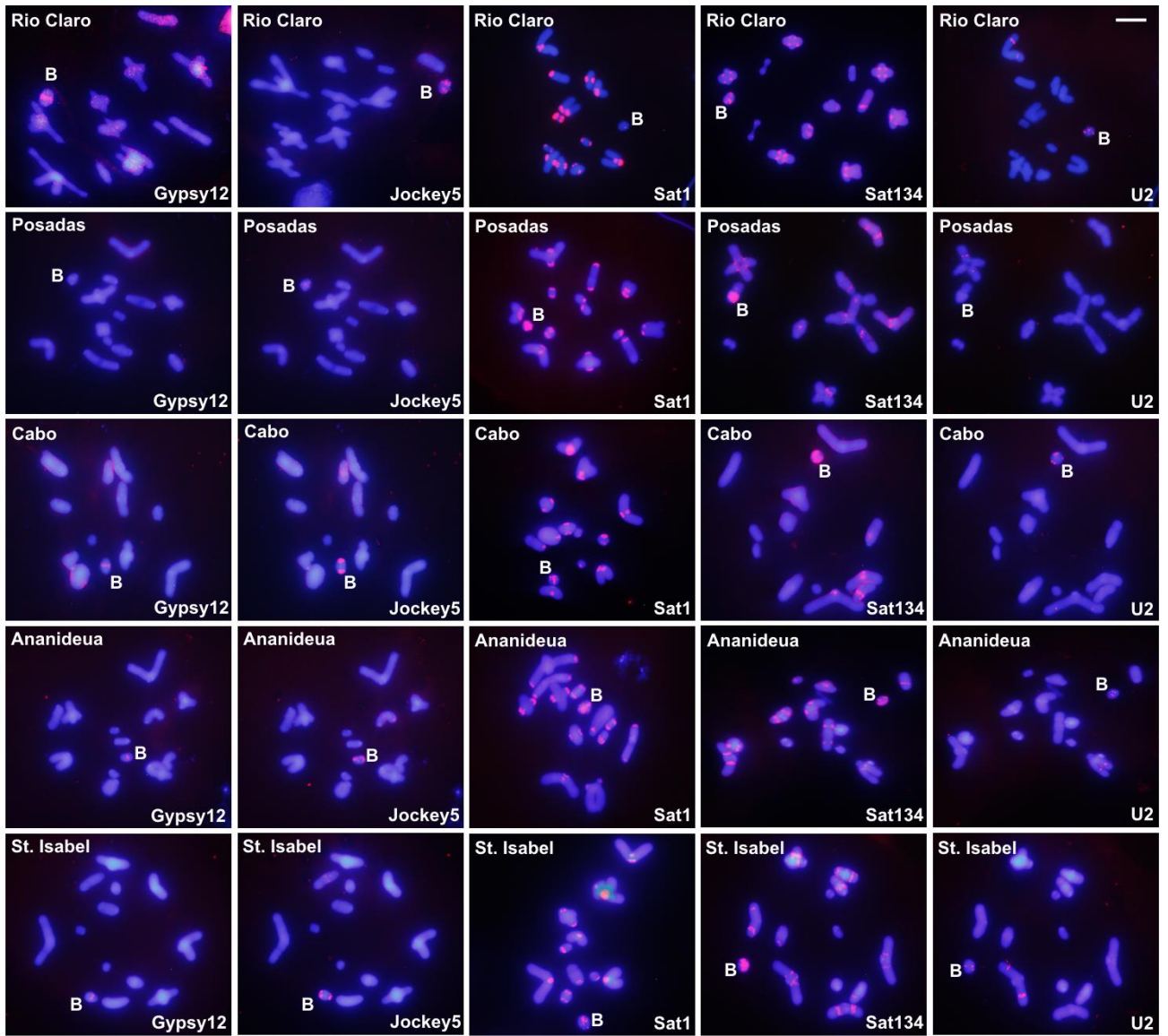


Tabela 2. Localização cromossômica de cada DNA repetitivo analisado nas diferentes populações de *Abracris flavolineata*.

Populações	DNA repetitivo	Posição cromossômica detectada por FISH													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	B	X	
São Paulo – Rio Claro	AflSat_1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	
	AflSat_134	p	p	p	p	p	p	p	p	p	-	p	-	ct	p
	U2 snDNA	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-
	Afl_Gypsy12	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ncl	ip	ncl
	Afl_Jockey5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	id	-
Pernambuco – Cabo	AflSat_1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	ncl	c
	AflSat_134	-	-	-	-	i	-	-	c	-	-	-	-	ct	-
	U2 snDNA	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-
	Afl_Gypsy12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ip	-
	Afl_Jockey5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	id	-
Pará – Sta Isabel	AflSat_1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	ncl	c
	AflSat_134	p	p	p	p	p	p	p	p	p	-	p	-	ct	p
	U2 snDNA	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-
	Afl_Gypsy12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ip	-
	Afl_Jockey5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	id	-
Pará – Ananideua	AflSat_1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	ncl	c
	AflSat_134	p	p	p	p	p	p	p	p	p	-	p	-	ct	p
	U2 snDNA	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-
	Afl_Gypsy12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ip	-
	Afl_Jockey5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	id	-
Argentina – Misiones / Posadas	AflSat_1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	ncl	c
	AflSat_134	p	p	p	p	p	p	p	p	p	-	p	-	ncl	p
	U2 snDNA	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Afl_Gypsy12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Afl_Jockey5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	p	-

c= centromérico; i= intersticial; d= distal; p= proximal; t= telomérico; ncl= não clusterizado.

Figura 2. Mapeamento por FISH de DNAs repetitivos em células meióticas de folículos com presença de cromossomo B em indivíduos machos de *Abracris flavolineata* de diferentes populações. Barra = 5 μ m.



Discussão

Os cromossomos B podem atingir frequências altas em populações naturais, dependendo tanto da tolerância da espécie a esses elementos adicionais, como na força do mecanismo de acumulação destes cromossomos (CAMACHO 2005). Plantas de milho foram encontradas com 34 cromossomos B (JONES e REES 1982), outro exemplo é a espécie de cebolinha *Allium schoenoprasum* que foi relatada tolerando até 20 cromossomos B em seu genoma (BOUGOURD *et al.* 1995). Nos ortópteros, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* é possível encontrar indivíduos com até três cromossomos B em populações naturais (CAMACHO *et al.* 1997), em *Xyleus dicoideus angulatus*, observou-se uma variação de zero a dois cromossomos B nos indivíduos de populações naturais de Pernambuco e Ceará (BERNARDINO *et al.* 2017).

Para a espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata*, a ocorrência de cromossomo B mostrou-se variável entre as populações. A presença de um ou dois cromossomos foi relatada na população de Rio Claro/SP, com frequência de 13.5% (MILANI *et al.* 2017). Porém, as distintas populações naturais de *A. flavolineata* analisadas neste trabalho apresentaram ocorrência de apenas um cromossomo B, com frequência de 7,14% (um indivíduo) para a população de Posadas/ARG, enquanto que para Cabo/PE foi a maior, com prevalência de 21,05% (quatro indivíduos). Excepcionalmente, a população de Santa Bárbara do Pará/PA não apresentou presença de cromossomo B em nenhum de seus indivíduos, sugerindo diferença de acumulação e transmissão.

De acordo com Camacho *et al.* (2000), a flutuação da frequência e acúmulo de cromossomos B nessas populações naturais pode ser explicada por fatores seletivos variados, tais como diferenças na taxa de parasitismo, tolerância da espécie, deriva genética e intensidade de acumulação de cromossomos B entre as populações. Adicionalmente, as características do ambiente local, associadas ao possível isolamento reprodutivo, causadas por processos de vicariância (e.g. surgimento de uma barreira natural), também poderiam influenciar a variação da frequência do cromossomo B.

A natureza tipicamente heterocromática do cromossomo B, revelada por banda-C, demonstra a acumulação geral de DNAs repetitivos, uma vez que a região da heterocromatina constitutiva é geralmente composta por blocos de satélites (BIGOT *et al.* 1990; CHARLESWORTH *et al.* 1994), similarmente como observado na população de Posadas/ARG, em que o cromossomo B revelou um padrão totalmente C-positivo e enriquecido de DNA satélite (Figura 2; Tabela 2), indicando sua natureza heterocromática.

No entanto, as demais populações analisadas (Cabo/PE, Santa Izabel/PA e Ananindeua/PA) apresentaram um padrão C-negativo, indicando baixa acumulação de DNAs repetitivos, similar à população de Rio Claro/SP (BUENO *et al.* 2013). Além disso, este padrão sugere uma não homogeneização do complemento A com o cromossomo B em *Abracris flavolineata*, podendo indicar uma origem recente desse cromossomo sem o acúmulo de DNAs repetitivos (BUENO *et al.* 2013). Estes resultados sugerem uma aproximação de composição no cromossomo B dessas populações, se distanciando da população de Posadas/ARG que mostrou o padrão mais diferenciado. Estes dados também podem indicar origem independente do cromossomo B da população da Argentina e a natureza heterocromática do mesmo sugere que ele é mais antigo, pois acumulou mais DNAs repetitivos.

Considerando a composição molecular do cromossomo B, estes geralmente apresentam sequências repetitivas de DNA, tais como famílias multigênicas, DNAs satélites e elementos transponíveis (CAMACHO 2005; JONES *et al.* 2008; HOUBEN *et al.* 2013). Nossos resultados revelaram um compartilhamento de sinal do gene U2 snDNA no par 1 do complemento A com o cromossomo B, nas regiões eucromáticas (C-negativas) nas diferentes populações, como relatado para a população de Rio Claro/SP, reforçando que a possível origem do cromossomo B em *Abracris flavolineata* está relacionada ao maior par autossômico (par 1) (BUENO *et al.* 2013). Entretanto, o cromossomo B da população de Posadas/ARG não revelou sinal de compartilhamento do gene U2 snDNA com complemento A. Isto pode ser explicado pela natureza heterocromática do cromossomo B desta população, evidenciando uma possível variante de cromossomo B para esta espécie.

Os elementos transponíveis (TEs) possuem a capacidade de movimentação dentro do genoma, influenciando seu acúmulo e geração de polimorfismos (DOOLITTLE e SAPIEZA 1980; ORGEL e CRICK 1980). Estes elementos são geralmente encontrados em regiões heterocromáticas, com baixa densidade gênica (DIMITRI *et al.* 2003), entretanto, como observado em *E. plorans* (MONTIEL *et al.* 2012) e para os TEs *Afmar1* e *Afmar2* (PALACIOS-GIMENEZ *et al.* 2014), o elemento transponível *Afl_Gypsy-12* revelou sinal em regiões eucromáticas dos cromossomos B das distintas populações, exceto para a população da Argentina, além de revelar sinais fracos e espalhados nas regiões eucromáticas dos cromossomos do complemento A de Rio Claro/SP. Esta similaridade no padrão de distribuição pode ser um recurso comum nas regiões eucromáticas dos cromossomos de gafanhotos, como também, pela

mobilidade e amplificação de elementos transponíveis neste grupo, como sugerido por Palacios-Gimenez *et al.* (2014). Para o elemento transponível Afl_Jockey-5, os sinais não clusterizados foram menos amplificados pelos cromossomos do complemento A, apresentando-se em blocos em ambas extremidades dos braços do cromossomo B, com exceção da população da Argentina, que teve um pequeno sinal proximal.

Os DNAs satélites são sequências altamente repetitivas com ampla variabilidade estrutural, estando predominantemente acumuladas em regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos (LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS 2012; CHARLESWORTH *et al.* 1994). O mapeamento por FISH revelou para o DNA satélite AflSat_1 sinal centromérico no cromossomo B para todas as populações, sendo mais evidente em Posadas/ARG e apenas um pequeno sinal no B de Rio Claro/SP. Contudo, observando de forma geral, o DNA satélite AflSat_134 apresentou blocos de sinais agrupados nas regiões centromérica e telomérica dos cromossomos B das diferentes populações, padrão observado no B de Rio Claro/SP (MILANI *et al.* 2018, em preparação). Diferentemente, a população da Argentina apresentou para o AflSat_134 sinais por toda extensão do cromossomo B. Estes dados reforçam a ocorrência de uma variante distinta de cromossomo B na população da Argentina.

Este padrão observado entre as distintas populações e Rio Claro/SP, com exceção de Posadas/ARG, pode indicar uma aproximação na composição molecular deste elemento supranumerário nessas populações, sugerindo origem comum. Além disso, o padrão diferenciado observado na população de Posadas/ARG pode sugerir que o cromossomo B desta população seja uma nova variante, com diferente origem das demais populações.

Considerações Finais

As análises, realizadas neste trabalho, puderam elucidar questões sobre as diferentes taxas de acumulação, distribuição geográfica, evolução e composição do cromossomo B. Os resultados mostraram uma possível similaridade da composição e origem do cromossomo B das distintas populações com o B de Rio Claro/SP. Além de apresentar na população de Posadas/ARG uma nova provável variante, com diferente origem, do elemento supranumerário no gafanhoto *Abracris flavolineata*.

O próximo passo deste trabalho é aprofundar os estudos acerca da composição desses cromossomos B e verificar a ocorrência de fluxo gênico entre as populações para entender com maior precisão a dinâmica geográfica do cromossomo B em *A. flavolineata*.

Referências Bibliográficas

ABDELAZIZ, M.; TERUEL, M.; CHOBANOV, D.; CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J. Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. **Cytogenetic Genome Res**, 119:143-146, 2007.

ANJOS, A.; LORETO, V.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Organization of some repetitive DNAs and B chromosomes in the grasshopper *Eumastusia koebelei koebelei* (Rehn, 1909) (Orthoptera, Acrididae, Leptysminae). **Comparative Cytogenetics**, v. 10, p. 219-228, 2016.

ANLEITNER, J.; HAYMER, D. Y enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Chromosoma**, 101: 271-278, 1992.

BAKKALI, M., et al. Population differences in the expression of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Protoplasma**, v.217 p.185-190, 2001.

BERNARDINO, A. C. S.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MACHADO, C. B.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; SANTOS, N.; LORETO, V. B Chromosome Variants of the Grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* are Potentially Derived from Pericentromeric DNA. **Cytogenet Genome Res.**, 152, 213-221, 2017.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: An impresision of the 1st B-chromosome conference. **Heredity**, v. 73 p 928-996, 1994.

BIDAU, C. J. Influence of a rare unstable B-chromosome on chiasma frequency and nonhaploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). **Genetica**, v. 73 p. 201-210, 1987.

BIDAU, C. J.; ROSATO, M.; MARTÍ, D. A. FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distorsion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). **Cytogenet Genome Res**, v. 106, p. 295-301, 2004.

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

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Res.**, 23, 415–420, 2015.

BOUGOURD, S. M.; PLOWMAN, A. B.; PONSFORD, N. R. *et al.* The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In: Brandham PE, Bennet MD eds. **Kew Chromosome Conference IV**. Kew: Royal Botanic Gardens, 21–34, 1995.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PLoS ONE**, v. 8 e66532, 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 DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104 p. 393-400, 2010.

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; RUÍZ-ESTÉVEN, M.; GÓMEZ, R.; PETITPIERRE, E.; RUFAS, J. S.; MASSA, B.; KAMEL BEN HALIMA, M.; CAMACHO, J. P. M.; B1 Was the Ancestor B Chromosome Variant in the Western Mediterranean Area in the Grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res.**, 142:54-58, 2014.

CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; GÓMEZ, R. *et al.* Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. **Chromosome Res.** 11: 375, 2003.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes, pp. 223–286 in *The Evolution of the Genome*, Ed. 1, edited by T. R. Gregory. 2005.

CAMACHO, J. P. M., *et al.* The B chromosomes of the grasshopper *Eyrepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. **Genetica**, v.117 p.77–84, jan. 2003.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Phil Trans R Soc Lond B**, v.355 p.163-178, feb. 2000.

CAMACHO, J. P. M.; SHAW, M. W.; LÓPEZ–LEÓN, M. D. *et al.* Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Am Nat**, 149:1030–1050, 1997.

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

DIMITRI, P.; JUKANOVIC, N.; ARCA, B. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 20: 503-512, 2003.

DOOLITTLE, W. F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, 284: 601-603, 1980.

FELICIELLO, I.; AKRAP, I.; BRAJKOVIC, J.; ZLATAR, I.; UGARKOVIC, D. Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Genome Biol. Evol.** 7, 228-239, 2014.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Ann Rev Genet**, 41:331-368, 2007.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenet. Genome Res.** 146, 153-170, 2015.

GREEN, D. M. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, p. 818-824, 1999.

GRENFELL, A. W.; STRZELECKA, M.; HEAL, R. Transcription brings the complex(ity) to the centromere. **Cell Cycle**. 16, 235-236, 2017.

GUTKNECHT, J.; SPERLICH, D.; BACHMANN, L. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**, v.103 p.539-544, feb. 1995.

HENIKOFF, S.; MALIK, H. S. Selfish drivers. **Nature**, v. 417, p. 227, 2002.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, p. 467-478, 2014.

HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMME, S.; TIMMIS, J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cell Mol Life Sci** 71: 467–478, july. 2013.

JAMILENA, M.; RUIZ-REJÓN, C.; RUIZ-REJÓN, M. A molecular analysis of the origin of the *Crepis Capillaris* B chromosome. **J Cell Sci**, v. 107, p. 703-708, 1994.

JOHN, B.; MIKLOS, G. L. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. In: Bourne GH, Danielli JF (Eds.). International Review of Cytology, New York: **Academic Press**, v.58, pp. 1-114, 1979.

JONES, R. N. B chromosomes in plants. Tansley review, n. 85, **New Phytol**, v. 131, p. 411-434, 1995.

JONES, R. N.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; VEGA, J. M.; PUERTAS, M. J. Chromosomes with a life of their own. **Cytogenet Genome Res**, v. 120, p. 265-80, 2008.

JONES, R. N.; REES, H. B chromosome. New York: **Academic Press**, 1982.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v.115 p.49–63, may. 2002.

KIDWELL, M. G.; LISH, D. Transposable elements as sources of variation animals and plants. **Proc Natl Acad Sci, USA** v.94 p.7704–7711, 1997.

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

LEVY, S.; SUTTON, G.; NG, P. C.; FEUK, L.; HALPERN, A. L.; WALENZ, B. P.; AXELROD, N.; HUANG, J.; KIRKNESS, E. F.; DENISOV, G.; *et al.* The diploid genome sequence of an individual human. **PloS Biol.** 5, e254, 2007.

LIAO, D.; PAVELITZ, T.; WEINER, A. M. Characterization of a novel class of interspersed LTR elements in primate genomes: structure, genomic distribution, and evolution. **J. Mol. Evol.** 46:649–60, 1998.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dyn.** v. 7, p.1-28, 2012.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; DZYUBENKO, V. V.; BUGROV, A. G.; KARAMYSHEVA, T. V.; RUBTSOV, N. B.; CAMACHO, J. P. M. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 121, p. 260-265, 2008.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S.; HEWITT, G. M.; CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, v. 2, p. 87-92, 1994.

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.

MACAS, J.; NEUMANN, P.; NAVRATILOVA, A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Mendicago truncatula*. **BMC Genom.**, 8, 427, 2007.

MARQUES, A., et al. Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. **Molecular Cytogenetics**, v.5 p.34, jul. 2012.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (Eds.). **Fish Cytogenetics**. Enfield, New Hampshire: Science Publisher, pp. 421-453, 2007.

MESSIER W.; Li, S. H.; STEWART, C. B. The birth of microsatellites. **Nature** 381:483, 1996.

MESTROVIC, N.; PLOHL, M.; MRAVINAC, B.; UGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*-experimental evidence for the "library" hypothesis. **Mol. Biol.** 15, 1062-1068, 1998.

MIGA, K. H. Completing the human genome: The progress and challenge of satellite DNA assembly. **Chromosome Res.** 23, 421-426, 2015.

MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PLoS ONE**, v. 9, e97956, 2014.

MILANI, D.; RAMOS, E.; LORETO, V.; MARTÍ, D. A.; CARDOSO, A. L.; MORAES, C. M. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0548-9>, 2017.

MONTIEL, E. E.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. A. Gypsy, RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. **Genetica**. 140: 365-374, 2012.

MRAVINAC, B.; PLOHL, M.; MESTROVIC, N.; UGARKOVIC, D. Sequence of PRat satellite DNA “frozen” in some Coleopteran species. **J. Mol. Evol.** 54, 774-783, 2002.

MRAVINAC, B.; PLOHL, M.; UGARKOVIC, D. Preservation and high sequence conservation of satellite DNAs suggest functional constraints. **J. Mol. Evol.** 61, 542-550, 2005.

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

NUR, U.; WERREN, J. H.; EICKBUSH, D. G.; BURKE, W. D.; EICKBUSH, T. H. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**, v. 240, p. 512-514, 1988.

OLIVEIRA, N., et al. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and colocalization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular Cytogenetics**, v.4 p.24, sep. 2011.

ORGEL, L. E.; CRICK, F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**. 284: 604-607, 1980.

ÖSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot Notiser**, v.2 p.157-163, 1945.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; BUENO, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of two Mariner-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) reveals enrichment in euchromatin. **Eur J Entomol**, v. 111, p. 329-334, 2014.

PALESTIS, B. G.; CABRERO, J.; TRIVERS, R.; CAMACHO, J. P. M. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. **Genetica**, v. 138, p. 1181-1189, 2010.

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

PAVELITZ, T.; LIAO, D.; WEINER, A. M. Concerted evolution of the tandem array encoding primate U2 snRNA (the RNU2 locus) is accompanied by dramatic remodeling of the junctions with flanking chromosomal sequences. **EMBO J**. 18:3783–92, 1999.

PEZER, Z.; BRAJKOVIC, J.; FELICIELLO, I.; UGARKOVIC, D. Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation. **Genome Dyn**. 7, 153-169, 2012.

PEZER, Z.; UGARKOVIC, D. Satellite DNA- associated siRNAs as mediators of heat shock response in insects. **RNA Biol**. 9, 587-595, 2012.

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. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 9138-42, 1988.

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

PLOHL, M.; MESTROVIC, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**. 123, 313-325, 2014.

PUERTAS, M. J. Nature and evolution of B chromosomes in plants: A noncoding but information-rich part of plant genomes. **Cytogenet Genome Res**, v.96 p.198-205, 2002.

RUIZ-RUANO, E. J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Sci Rep.**, 6, 28333, 2016.

RUIZ-RUANO, F. J.; RUIZ-ESTÉVEZ, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; LÓPEZ-PINO, J. L.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. DNA amount of X and B chromosomes in the grasshoppers *Eyprepocnemis plorans* and *Locusta migratoria*. **Cytogenet Genome Res** 134:120–126, 2011.

SHAPIRO, J. A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biol Rev**, 80:1-24, 2005.

SHAW, M. W.; HEWITT, G. M. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: Where next? In: Oxford Surveys in Evolutionary Biology (eds. Futuyma D, Antonovics J), **Oxford Univ. Press**, v.7 p.197-223, 1990.

SUMMER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl Cell Res**. 75: 304-306, 1972.

TERUEL, M., et al. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chromosoma**, v.119 p.217-225, apr. 2010.

TERUEL, M., et al. Level of heat shock proteins decreases in individuals carrying Bchromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v.132 p.94-9, aug. 2011.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN, P. C.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GRAPHODATSKY, A. S. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biol**, v. 11, p. 90, 2013.

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

VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; FANTINATTI, B. E. A.; MARQUES, D.; ALMEIDA, R. O.; SIMÕES, R. F.; MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, p. 1-9, 2016.

VOLOBUJEV, V. T.; TIMINA, N. Z. Unusually high number of B-chromosome and mosaicism by them in *Apodemus peninsuale* (Rodentia, Muridae). **Tsitologiya Genet** 14: 43-45, 1980.

WANG, X.; FANG, X.; YANG, P.; JIANG, X.; JIANG, F.; ZHAO, D.; LI, B.; CUI, F.; WEI, J.; MA C *et al.* The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. **Nat Commun** 5:2957, 2014.

WICKER, T., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Rev Genet**, v.8 p.973-982, dec. 2007.