
Ciências Biológicas

LUCAS ALBUQUERQUE DOS SANTOS

**TESTANDO A INTERFERÊNCIA NA FORMAÇÃO DE
ESPERMÁTIDES E ESTABILIDADE MEIÓTICA DO
CROMOSSOMO B DO GAFANHOTO *ABRACRIS
FLAVOLINETA***



Rio Claro
2018

LUCAS ALBUQUERQUE DOS SANTOS

TESTANDO A INTERFERÊNCIA NA FORMAÇÃO DE
ESPERMÁTIDES E ESTABILIDADE MEIÓTICA DO CROMOSSOMO
B DO GAFANHOTO *ABRACRIS FLAVOLINEATA*

Orientador: Diogo C. Cabral-de-Mello

Co-orientador: 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 e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2018

S237t

Santos, Lucas Albuquerque dos

Testando a interferência na formação de espermátides e estabilidade
meiótica do cromossomo B do gafanhoto *Abracris flavolineata* / Lucas
Albuquerque dos Santos. -- Rio Claro, 2018

30 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Rio Claro

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Coorientador: Diogo Milani

1. cromossomos supranumerários. 2. microespermátides. 3. Hibridização in
situ fluorescente. 4. DNA repetitivo. 5. espermatogênese. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

À minha família, dedico.

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, que fomentou minha pesquisa e garantiu minha permanência na universidade.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pela vaga em uma universidade pública e ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro pela manutenção do curso noturno apesar das eventuais pressões para não fazê-lo. Aos professores e professoras, aos funcionários e funcionárias, pelo trabalho que mantém essa instituição.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Citogenômica e Evolução Animal, do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biociências do campus de Rio Claro pela oportunidade de trabalho e colaboração. Principalmente ao Professor Doutor Diogo Cavalcanti Cabral De Mello e ao Mestre Diogo Milani pela orientação do trabalho.

Agradeço aos professores e professoras, funcionários e funcionárias da Escola Estadual Dr. Américo Marco Antônio e da Escola Municipal de Ensino Fundamental Professora Cecília Correa Castelaní pela contribuição na minha formação como indivíduo crítico.

Agradeço aos divulgadores, defensores e libertadores da ciência pela paixão e compromisso que me contagiaram.

Agradeço a minha família pela perseverança, incentivo e amor na minha ausência por tantos anos. Espero que sintam algum orgulho.

Agradeço a todos os amigos e colegas com quem compartilhei minha vida até aqui, sua influência me formou como pessoa. Seja na fila da merenda, atrás de um balcão de trabalho, em uma discussão de ideias nem sempre tão mirabolantes, no olhar refletido na janela de um vagão de metrô, sentados em uma calçada, em uma partida de *video game* ou literalmente dividindo uma fogueira e um vinho. Especialmente aos meus amigos da turma de 2013 pela companhia nesse período e aos meus colegas de quarto pela fraternidade, pelo lar que me proporcionaram.

Agradeço especialmente a Luiza pela amizade e pelo amor dedicado a mim e às palavras difíceis. Pela inspiração em ser uma pessoa melhor, um cientista melhor. Pelo dinheiro emprestado sem a perspectiva de retorno imediato.

Graças a vocês, esse não será o meu último trabalho.

"If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants."

Isaac Newton

Resumo

Uma das perguntas mais persistentes e intrigantes sobre aos cromossomos supranumerários (B) são relacionadas aos mecanismos que os fazem segregar e persistir através das gerações e que efeitos eles poderiam causar em seus hospedeiros. Uma vez que esses elementos não estão de acordo com a lei Mendeliana de herança e segregação, eles são caracterizados por apresentar processos de acumulação meiótico e/ou mitótico distintos que poderiam levá-los a uma taxa de transmissão mais alta que o complemento normal de cromossomos. Como resposta, o genoma hospedeiro pode desenvolver mecanismos de defesa que contrapõem esse impulso egoísta. Deste modo, a associação da presença de cromossomos B e a produção de espermátides anormais podem estar intimamente relacionada. No presente trabalho, investigamos a dinâmica de herança, possível expulsão preferencial e interferência do cromossomo B na formação de gametas masculinos na espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata* coletados na região de Rio Claro/SP. A marcação dos cromossomos B por FISH foi feita com a sonda do gene U2 snDNA, enquanto a marcação dos cromossomos A foi feita com a sonda do DNA satélite AflaSAT-1. As macroespermátides foram coradas com Nitrato de Prata para a visualização dos adjuntos centriolares, a fim de determinar a ploidia da célula. Nossos resultados apontaram um aumento em cerca de 30% no número de macroespermátides em indivíduos portadores de cromossomos B. Houve também uma redução de 23% das espermátides normais contendo 2 cromossomos B, além da presença desses cromossomos em 81.6% das microespermátides analisadas, onde em quase sua totalidade não foi registrado a presença dos cromossomos A. É a primeira vez que se registra esse tipo de fenômeno em Orthoptera e nossos dados indicam que possivelmente há um mecanismo de defesa por expulsão preferencial dos cromossomos B em microespermátides.

Palavras-chave: cromossomos supranumerários, microespermátides, Hibridização in situ fluorescente, DNA repetitivo, espermatogênese.

Sumário

1. Introdução	7
1.1 Cromossomos B	7
1.2 <i>Abracris flavolineata</i> (De Geer, 1773) (Orthoptera)	12
2. Objetivos	13
2.1 Objetivos e metas específicas	13
3. Materiais e métodos	14
3.1 Material biológico	14
3.2 Preparação das lâminas e técnicas de análises cromossômicas	14
3.3 Contagem de espermátides	15
4. Resultados e Discussão	16
4.1 Estabilidade do cromossomo B	16
4.2 Contagem de macroespermátides	17
4.3 Cromossomos B em espermátides viáveis	19
4.4 Expulsão de cromossomos B em microespermátides	22
5. Conclusão	24
6. Referências	25

1. Introdução

1.1 Cromossomos B

O genoma dos eucariotos é composto por um complemento padrão de cromossomos (cromossomos A), entretanto, somam-se a eles elementos variáveis egoístas que não obedecem às leis de herança mendeliana. Exemplos notáveis são os *transposons*, desordens de segregação, fatores citoplasmáticos e cromossomos supranumerários, chamados de cromossomos B (CAMACHO, 2000).

O termo cromossomo B foi proposto originalmente por Randolph em 1928 (citado em GREEN, 1990), e, apesar de ter sido tratado por diferentes nomes ao longo do tempo (MÜNTZIG, 1944 e 1948; HAKANSON 1945 e 1948; COVERT, 1998), tem sido o termo mais utilizado mesmo após 90 anos. A definição proposta em 1994 por Camacho e Parker durante a primeira conferência sobre cromossomos B é: "cromossomos adicionais dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações de algumas espécies, que derivam de cromossomos A mas seguem seu próprio caminho evolutivo" (em BEUKEBOOM, 1994).

Os estudos relacionados a estes cromossomos datam, pelo menos, desde o início do século XX e partem da sua detecção na espécie de percevejo do gênero *Metapodius* (WILSON, 1907) e seu registro em plantas no milho doce *Zea mays* (KUWADA, 1915). Nos anos 1940, esses cromossomos extra foram apontados como elementos parasitas no genoma devido ao seu comportamento durante a divisão celular (ÖSTERGREN, 1945). Kimura e Kayano (1961) foram os primeiros a descrever a teoria matemática para analisar o mecanismo de distribuição dos Bs em uma população natural de plantas. Posteriormente, discute-se sua natureza egoísta, onde é discutida a capacidade de cromossomos B expressarem genes que resultam em maior sucesso na sua manutenção e transmissão em detrimento do complemento A (NUR, 1988; JONES, 1985 e 1995). Com o avanço tecnológico nas pesquisas, os cromossomos B são estudados sob a perspectiva de sua expressão gênica (HUANG et al., 2016). Por exemplo, o fungo *Nectria hematococca* contém

apenas no seu cromossomo B os genes necessários para a desintoxicação de um composto defensivo produzido pela ervilha *Pisum sativum*. Nesse caso, sua presença resulta uma variante patogênica do fungo (MIAO, 1991).

Outra abordagem possível sobre os cromossomos B é seu padrão de hereditariedade e os mecanismos envolvidos. Em vespas do gênero *Nasonia* há um caso mais extremo ligado a proporção sexual. Seu acúmulo está relacionado à capacidade de destruir cromossomos paternos (WERREN, 1991). Entretanto, é válido ressaltar que essa natureza parasita e egoísta não foi a única hipótese trabalhada na bibliografia pertinente. Alternativamente, por exemplo, os cromossomos B podem manter-se na população por serem benéficos a ela em baixa quantidade (DARLINGTON, 1958; WHITE, 1973). Essa vertente é fortalecida pelos resultados dos estudos com a cebolinha *Allium schoenoprasum* de Plowman e Bougourd (1994), e de Bougourd e colaboradores (1995). Onde os cromossomos B parecem conferir vantagens na germinação de sementes em condições de estresse hídrico (CAMACHO, 2005).

Cerca de 15% das espécies analisadas citogeneticamente apresentam cromossomos B (1685 espécies), distribuídos em fungos (13 espécies), plantas (1152) e animais (520). Alguns grupos dentro dessas taxa têm uma maior ocorrência registrada, mas isso se explica pelo viés da frequência desses grupos como modelo de estudos dos pesquisadores (JONES, 2017).

O sequenciamento do DNA permitiu investigar com maior resolução as origens dos cromossomos B. No plural, pois, mesmo que derivados do complemento A, os cromossomos extra surgem de maneiras distintas nas diversas espécies, e têm diferentes arranjos moleculares. O tamanho, outra importante variável, pode ir de apenas aproximadamente um centrômero, como o da espécie de mosca *Megaselia scalaris* (WOLF et al, 1991), até o cromossomo B do peixe *Alburnus alburnus*, que chega a quase 10% do genoma (SCHMID, 2006). Ocasionalmente, há uma variedade considerável de tamanho e morfologia dentro de uma mesma espécie, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, estudado por Henriques-Gil et al. (1984) e López-León et al. (1993), em que cinquenta variáveis do cromossomo B foram descritas (POYATO, 2010).

Os cromossomos B originam-se de autossomos, cromossomos sexuais e cruzamentos intra- e inter- específicos (JONES e REES, 1982; CAMACHO 2000). Porém, apesar de muitas particularidades que não podem ser extrapoladas de uma

espécie para outras, eles compartilham características biológicas em diferentes níveis, de estruturas básicas à dinâmica populacional (CAMACHO, 2005).

Amos e Dover (1981) propuseram pela primeira vez a massiva amplificação de DNA satélite nos cromossomos B. Uma análise variada em diversas espécies de animais e plantas mostrou que esses cromossomos estão repletos de DNA repetitivo. É concebível que haja regiões de genes em meio às sequências repetitivas, já que foram registrados estudos em que a presença do cromossomo supranumerário teve interferência significativa no fenótipo dos espécimes (GREEN, 1988; BROCKHOUSE et al., 1989; PERFECTTI e WARREN, 2001). Além, claro, dos genes responsáveis pelos mecanismos de manutenção do DNA parasita no genoma. Porém, são mais difíceis de analisar em meio a grande quantidade de DNA repetitivo. Dois terços do cromossomo B em *E. plorans* é composto por sequências repetitivas, por exemplo (LÓPEZ-LEÓN, 1994).

Os genes de DNA ribossomal são encontrados com maior facilidade. Nos cromossomos A, esses genes estão organizados em *tandem* nas regiões organizadoras de nucléolo (NOR em inglês). Com nitrato de prata é possível observar NORs ativas também em cromossomos B (CAMACHO, 2005).

Também se mostraram presentes três transcritos pertencentes a uma família de sequências altamente repetitivas que apresentam similaridade com elementos móveis (CARCHILAN et al., 2009). Pesquisas registram as famílias multigênicas de RNAr 18S, 5S, RNAsn U2 e histonas (LÓPEZ-LEÓN et al., 2008; LORETO et al., 2008; TERUEL et al., 2010; BUENO et al., 2013). Outro estudo descreve um elemento derivado de um retrotransposon no cromossomo B de milho (LAMB et al., 2007). Adicionalmente, foi observada a ocorrência de blocos de DNA telomérico em regiões não usuais (WUSTER-HILL et al., 1988; SILVA e YONENAGA-YASSUDA, 1998), o que indica que a origem desses cromossomos B pode estar relacionada à reorganização cromossômica (POYATO, 2010).

A evolução a longo prazo de cromossomos B é uma corrida armamentista entre esse elemento egoísta e o genoma padrão (ZURITA, 1998). Eles normalmente apresentam mecanismos de impulso genético, ou “*genetic drive*” (JONES, 1991). Esse impulso emerge de atividades onipresentes de mudança do DNA (como *crossing over* desigual, conversão de genes e transposição) e é um processo evolutivo como a seleção natural e deriva genética, que muda a composição de uma população ao longo das gerações (DOVER, 2002). Esses mecanismos de impulso

permitem que os cromossomos B persistam na população apesar de um eventual malefício aos hospedeiros. A teoria padrão do egoísmo prevê que o polimorfismo do cromossomo B atinja um equilíbrio entre duas forças de ação oposta em relação a si mesmo: “drive” e prejuízo à aptidão dos indivíduos (JONES, 1995; SHAW e HEWITT, 1990; BEUKEBOOM, 1994). Os cromossomos padrão, por outro lado, também podem contra-atacar esse equilíbrio e manifestar genes que suprimem o impulso tornando-os neutros e propensos à perda estocástica (CAMACHO et al., 1997). Na Espanha, Herrera et al. (1996) observaram que os cromossomos B de *E. plorans* se transmitiam em taxa mendeliana em cruzamento de fêmeas portadoras de dois cromossomos B (2B) com machos não portadores de cromossomos B (0B) da mesma população. Quando as mesmas fêmeas 2B cruzavam com machos 0B de uma população que não tinha registro de cromossomos B, ele apresentava “drive” genético. Isso foi uma evidência de que o complemento A padrão onde o cromossomo B ocorria suprimia-o a quase neutralidade, o condenando à extinção, a menos que desenvolva um polimorfismo que evite essa defesa para retomar o impulso (HERRERA et al., 1996).

Assim como há uma variedade de fenômenos decorrentes da presença de cromossomos B nas diversas espécies, é plausível imaginar que também haja uma gama de alternativas dos genomas hospedeiros. Além da supressão como um mecanismo de defesa clássico, outra hipótese notável é a sugerida por Cabrero e colaboradores (2017). Nesse estudo, os pesquisadores analisaram a eventual expulsão de cromossomos B em populações espanholas dos gafanhotos *Eumigus monticola* e *Eyrepocnemis plorans*. Os experimentos de Teruel e colaboradores (2009) sinalizam que em *E. plorans* há um aumento da formação de células germinativas aberrantes na presença do cromossomo supranumerário. Durante o processo de formação de espermatozoides dessa espécie (espermiogênese), é possível observar em microscopia de luz a ocorrência de espermatozoides em fase iniciais de desenvolvimento (espermátides) com super crescimento e poliploidia (macroespermátides) ou miniaturização (microespermátides), resultado de uma provável interferência de cromossomos B na meiose, já que foram registradas frequências muito maiores dessas células aberrantes em indivíduos portadores (ver TERUEL, 2009). Com base nisso, Cabrero e colaboradores (2017) investigaram essas espermátides aberrantes como uma eventual alternativa ao genoma padrão

dos hospedeiros em relação aos cromossomos B, diminuindo seu sucesso na população os descartando em espermátides inviáveis.

Na maior parte do reino animal, os gametas são produzidos diretamente por meiose, não havendo uma fase de gametófito no ciclo de vida e o "*drive*" em machos em fêmeas é inteiramente baseado no comportamento de B na meiose (JONES, 2018). Com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares para cromossomos A e B, é possível aprofundar essa linha de raciocínio nessas espécies supracitadas e em outros grupos. Este estudo buscou testar essas hipóteses de interferência e expulsão usando como modelo um gafanhoto americano menos explorado, a espécie *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773), visando auxiliar no entendimento dos padrões evolutivos deste cromossomo e seus mecanismos de manutenção ou expulsão do genoma.

1.2 *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) (Orthoptera)

O gafanhoto *Abracris flavolineata* está distribuído no Brasil latitudinalmente do Rio Grande do Sul à Amazônia e a população de Rio Claro (no Estado de São Paulo) apresenta cromossomos B. Um diferencial dessa espécie é que seu cromossomo B totalmente C-negativo não é tão enriquecido de sequências de DNA repetitivo ligados à heterocromatina como em outros gafanhotos modelo (BUENO et al, 2013; HOUBEN et al, 2014), portanto, o tornando um modelo de interesse para pesquisas sobre a composição, evolução e possível atividade de transcrição de seu cromossomo B. Ademais, Bueno et al (2013) relatou o único caso em gafanhotos da presença de grandes blocos do gene U2 snDNA em ambos os braços do cromossomo B de *Abracris flavolineata*, sugerindo que esse B pode carregar muitos genes já que apresenta um gene envolvido com splicing e pouca abundância de DNA repetitivos (MILANI et al, em preparação).

Algumas abordagens em relação aos seus cromossomos A e B vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos (MILANI et al, 2014; 2017; FERRETI, 2016; MENEZES-DE-CARVALHO et al, 2015; PALACIOS-GIMENEZ et al, 2014; BUENO et al, 2013). Entretanto, ainda é um modelo muito menos investigado que outras espécies de Orthoptera. Milani e colaboradores têm descoberto possíveis marcadores moleculares de diferentes classes de DNA repetitivos de cromossomos A e B para essa espécie (2017ab) que servirão como ferramentas para pesquisas futuras. Entre esses estudos, o teste da interferência de cromossomos supranumerários na formação de espermatídes e um possível mecanismo de expulsão desses cromossomos aqui proposto.

2. Objetivos

Investigar a possível ocorrência de um mecanismo de defesa do genoma hospedeiro de cromossomos B por sua expulsão em células inviáveis reprodutivamente na espécie de gafanhoto *Abracris flavolineata*.

2.1 Objetivos e metas específicas

- Observar se há variação intrafolicular e interfolicular para a presença de cromossomo B visando verificar se esse elemento apresenta uma instabilidade mitótica.
- Analisar a proporção de espermátides aberrantes em indivíduos machos portadores e não portadores de cromossomos B nessa espécie, a fim de verificar a influência da presença de cromossomos B na produção das mesmas.
- Verificar a taxa de transmissão de cromossomos B em espermátides viáveis de indivíduos machos portadores e não portadores de cromossomos B.
- Testar se existe um mecanismo de expulsão preferencial de cromossomos B a partir da análise de presença de cromossomos B e do complemento A em microespermátides com sondas do gene U2 snDNA e DNA satélite AflaSAT-1.

3. Materiais e métodos

3.1 Material biológico

Espécimes machos adultos de *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) foram coletados no verão na região de Rio Claro no Estado de São Paulo, Brasil. Posteriormente, os folículos testiculares foram obtidos a partir da dissecação dos indivíduos e fixados em Carnoy modificado (3:1, Etanol:Ácido acético), então armazenados em freezer -20°C para as análises cromossômicas.

3.2 Preparação das lâminas e técnicas de análises cromossômicas

As lâminas de folículos testiculares de *A. flavolineata* foram obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento e foram coradas com Giemsa 5% e Nitrato de Prata para análises das macroespermátides ou sem coloração para posterior realização de hibridização *in situ* fluorescente (sigla FISH em inglês). Ao menos dez folículos por indivíduo foram analisados separadamente com solução de ácido acético 50% para a contagem dos cromossomos em microscopia de luz a fim de averiguar se, quando identificados portadores, os cromossomos B eram mitoticamente estáveis, ou seja, presente em todas as células. Para confirmar este resultado, realizamos FISH com o gene U2 snDNA marcador de cromossomo B em pelo menos dez folículos testiculares em todos os machos portadores de cromossomos B (11) separadamente. Ao menos 40 células por folículo foram contabilizadas.

A técnica de Nitrato de Prata foi realizada de acordo com protocolo descrito por Rufas et al. (1987) para identificar as macroespermátides, pelo tamanho e ploidia, devido ao número de adjuntos centriolares marcados. Como sugerido em Teruel et al. (2009).

A sonda de U2 snDNA foi obtida por amplificação da polimerase em cadeia (PCR) usando como molde o DNA genômico de *A. flavolineata* usando os *primers* descritos por Bueno et al. (2013). A sonda de DNA satélite AflaSAT-1 foi obtida igualmente a partir dos *primers* descritos por Milani et al. (2017). As condições de PCR partiram da desnaturação do DNA à 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos à 94°C por 30s, 53°C-60°C por 30s e 72°C por 5 min. Os fragmentos foram

marcados com digoxigenin-11-dUTP por Nick Translation e detectados pelo anticorpo anti-digoxigenina rodamina (Roche, Mannheim, Germany) ou biotina-14dUTP detectados com streptavidina Alexa Fluor-488 conjugado (Invitrogen, San Diego, CA, USA) para posterior uso como sondas em FISH. Os experimentos de FISH foram conduzidos seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1986), com pequenas adaptações de Cabral-de-Mello et al. (2010). As lâminas foram contra-coradas com DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole) e montadas com VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA).

As imagens foram capturadas em escala de cinza utilizando uma câmera digital refrigerada DP70 acoplada a um microscópio Olympus BX51 equipado com uma lâmpada de fluorescência e filtros apropriados. As imagens foram pseudo-coloridas, mescladas e tratadas para brilho e contraste com Adobe Photoshop CS6.

3.3 Contagem de espermátides

Foram considerados neste estudo dez indivíduos 0B, oito indivíduos 1B e três indivíduos 2B. Primeiramente, para os machos 0B, foi realizado uma coloração simples com DAPI em lâminas de meiose para contagem de microespermátides. As contagens de microespermátides para os machos 1B e 2B foram feitas com as lâminas de FISH. A análise estatística de presença de espermátides normais foi obtida a partir de uma comparação simples de porcentagens entre as categorias espermátides normais, micro- e macro- espermátides nas três condições acima, com o número mínimo de quatrocentas células observadas por indivíduo.

Os experimentos de FISH foram realizados para contagem de espermátides normais com e sem cromossomos B de machos portadores de 1B e 2B. Após a contagem, uma estimativa da taxa de segregação do cromossomo B foi calculada para as duas condições (1B e 2B).

Por fim, numa tentativa de observar uma possível expulsão preferencial de cromossomos B a partir de formação de microespermátides, contamos quantas delas apresentavam marcas de presença (U2 snDNA) de cromossomos B em indivíduos 1B e 2B e marcas do DNA satélite AflaSAT-1 representando regiões pericentroméricas de cromossomos do complemento A.

4. Resultados e Discussão

4.1 Estabilidade do cromossomo B

O cromossomo B de *A. flavolineata* carrega quatro blocos do gene U2snRNA em genomas portadores de B (BUENO et al 2013), de modo que a FISH com uma sonda de gene U2snRNA permite a fácil identificação de células portadoras e não portadoras de B em diferentes estágios de divisão. A partir da análise intra- e interfolicular de células em meiose, os cromossomos B foram considerados mitoticamente estáveis por estarem presentes em todas as células de todos os indivíduos portadores de B analisados.

Na literatura foi descrita uma grande maioria de cromossomos B mitoticamente estáveis com presença de cromossomo B em todos os tecidos e células (JONES e REES, 1982; PARKER et al., 1991; CAMACHO et al., 1997; CABRERO et al., 2017), no entanto, espécies de animais e plantas demonstraram alguma instabilidade em relação a esses elementos, tais como *Calliptamus palaestinensis* (NUR 1963), *Camnula pellucida* (NUR, 1969), *Aegilops mutica* (JONES e HOUBEN, 2003), *Locusta migratoria* (CABRERO et al., 1984), *Prochilodus lineatus* (CAVALLARO et al., 2000), *Crepis capillaris* (RUTISHAUSER e ROTHLSBERGER, 1966) e *Eumigus monticola* (CABRERO et al., 2017). Os cromossomos B instáveis poderiam ser um resultado da neutralização dos mecanismos de acumulação induzidos por falhas de divisão, como a não disjunção mitótica (VISERAS et al., 1990; CAVALLARO et al., 2000). Segundo Hewitt (1973), a instabilidade mitótica nas células da linhagem germinativa tende a aumentar o acúmulo de cromossomos B. Este fator pode estar associado a altos níveis de espermátides anormais em indivíduos portadores de cromossomos B (NUR, 1969; BIDAU, 1986; SUJA et al., 1987; TERUEL et al., 2009; CABRERO et al., 2017).

4.2 Contagem de macroespermátides

Em microscopia de luz, espermátides normais e anormais foram detectadas em outras espécies de gafanhotos por tamanho e número de adjuntos centriolares (ACs) (TERUEL et al., 2009), no entanto, em *A. flavolineata* é muito difícil diferenciar espermátides por tamanho, por terem tamanho similar, então neste trabalho detectamos principalmente por observações de ACs. A contagem de microespermátides foi possível em lâminas coradas com DAPI.

Espermátides normais mostraram AC únicos, enquanto macroespermátides mostraram 2 ou mais ACs dependendo do nível de ploidia (Figura 1a-c). As microespermátides possuem tamanho bastante reduzido (Figura 1d). Analisando as macroespermátides e espermátides normais em machos com e sem cromossomos B, observamos que os machos portadores de B formaram notavelmente mais macroespermátides chegando em 30% a mais para os portadores de B (Tabela 1). Esse resultado não é tão expressivo quanto o encontrado no gafanhoto europeu *Eyprepocnemis plorans* (TERUEL et al., 2009, CABRERO et al., 2017), em que os portadores apresentaram até 500% mais espermátides aberrantes. Entretanto, ainda é um aumento considerável. É necessário ressaltar que espécies distintas têm tolerâncias diferentes em relação aos cromossomos B. Além disso, células poliploides foram encontradas em portadores e não portadores, porém, indivíduos 0B apresentaram apenas células aberrantes diploides, enquanto os indivíduos portadores continham também células tetraploides (Figura 1). Esse fenômeno pode ser explicado por algumas hipóteses discutidas na literatura. Nur (1969) sugere que cromossomos B atrasados podem bloquear a citocinese nas duas divisões meióticas, levando à formação e restituição de núcleos poliploides. Suja e colaboradores (1989), baseados nos estudos de Philips (1970), sugerem que a diferenciação das espermátides (Figura 2) pode ser prejudicada pelo cromossomo B, uma vez que as células no mesmo cisto estão ligadas por pontes citoplasmáticas. Por fim, Loray et al. (1991) encontraram um aumento na formação de macroespermátides em *Dichroplus elongatus* mesmo em folículos testiculares que não portavam o cromossomo B, o que os levou a inferir que alguns folículos portadores causavam uma alteração fisiológica no desenvolvimento das células germinativas de uma maneira geral nos indivíduos.

Tabela 1. Contagem de macroespermátides em machos 0B, 1B e 2B.

Macroespermátides					
	n	2n	3n	4n	Proporção Total
0B	99.44%	0.50%	0.06%	-	0.56%
1B	97.90%	1.85%	0.17%	0.07%	2.14%
2B	98.80%	1.20%	-	-	1.21%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 - Espermátides normais e aberrantes de *A. flavolineata*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Espermátides normais e aberrantes de *A. flavolineata* preparadas com nitrato de prata (a-c) e DAPI (d). (a) Espermátide normal (n) e macroespermátide (2n). (b) Espermátide normal (n) e macroespermátide triploide (3n) com três adjuntos centriolares. (c) Macroespermátide tetraploide (4n) com quatro adjuntos centriolares. (d) Microespermátide (m) e uma espermátide normal (n).

Figura 2 - Espermátides coradas com DAPI em diferentes estágios de desenvolvimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

(r) Espermátide mais arredondada, menos desenvolvida. (a) Espermátide alongada tornando-se espermatozoide.

4.3 Cromossomos B em espermátides viáveis

Através da FISH foi possível observar claramente a sonda de snDNA U2 indicando a presença do cromossomo B nas espermátides (Figura 3). Em machos 1B, praticamente metade (48,2%) das espermátides normais continham o cromossomo extra (Tabela 2). Isso pode ser considerado uma segregação normal, uma vez que não há um aparente mecanismo de impulso para aumento desses cromossomos ou um mecanismo de deleção preferencial nas células viáveis. Parte da natureza parasita e egoísta de um cromossomo B pode levá-lo a preferencialmente se localizar em um polo específico durante a divisão, resultado em uma taxa de transmissão maior que 50% (*genetic drive*). No entanto, apenas um dos machos 1B mostrou uma taxa de transmissão (kB) com um valor p significativamente menor que 0,5 (m11), indicando que esse macho poderia possivelmente eliminar significativamente o B das espermátides (Tabela 2). Por outro lado, esse resultado poderia ter sido alcançado por um simples viés na amostragem.

Os indivíduos portadores de 2B apresentaram maior taxa de transmissão dos cromossomos B, com 75,8% (Tabela 2). Segundo a lei mendeliana de segregação, este resultado mostra que é esperada uma proporção igual ou próxima das células 0B e 2B, mas observamos uma diferença notável com uma menor proporção de espermátides portadoras de 2B (4%) e maior número de espermátides portadoras de 1B (67%) (Tabela 2). Este resultado mostra que houve uma diminuição de 23% de células viáveis com essa característica, e aumento do número de células viáveis 1B.

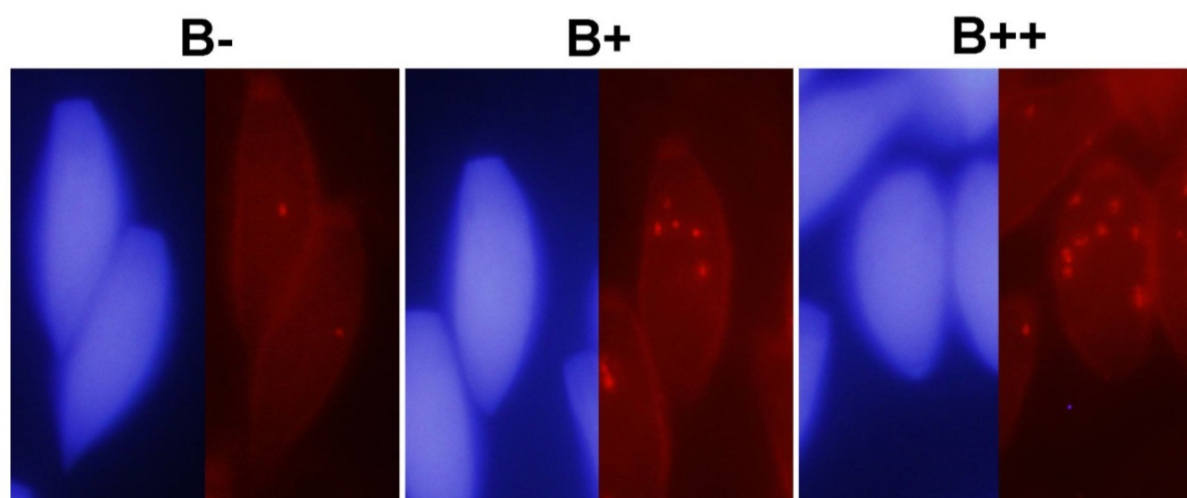
É possível inferir que há uma menor tolerância a essa presença de 2B na aptidão (*fitness*) dessa espécie e, portanto, o organismo diminui o número de cromossomos extra nas células germinativas. Resultados em *E. plorans* notaram uma diminuição de 5% a 25% na taxa de transmissão, pós-meiose (CABRERO et al., 2017). Um exemplo interessante dessa diferença de comportamento é observada nos estudos de Hewitt e colaboradores (1973, 1976 e 1987), onde os cromossomos B na espécie de gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* demonstraram uma tendência a se impulsionarem durante a oogênese ao preferencialmente se conservarem no oócito em detrimento dos corpos polares, enquanto nos machos houve uma eliminação pela disfunção do esperma (TERUEL, 2009).

Tabela 2. Frequência de segregação do cromossomo B em espermátides normais de machos 1B e 2B.

Id	N - Bs	0B	1B	2B	Média_Bs	kB
m11	1	0.61	0.39	0	0.395	0.395
m12	1	0.54	0.46	0	0.464	0.464
m13	1	0.54	0.46	0	0.463	0.463
m14	1	0.52	0.48	0	0.481	0.481
m15	1	0.49	0.51	0	0.508	0.508
m16	1	0.46	0.54	0	0.543	0.543
m17	1	0.47	0.53	0	0.530	0.530
m18	1	0.52	0.48	0	0.484	0.482
	Total 1B	0.52	0.48	0	0.484	0.482
m19	2	0.26	0.70	0.04	0.786	0.393
m20	2	0.32	0.64	0.04	0.717	0.359
m21	2	0.30	0.66	0.04	0.743	0.371
	Total 2B	0.29	0.67	0.04	0.758	0.374

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 - FISH com a sonda U2 snDNA como marcador de cromossomo B em espermátides normais de *A. flavolineata*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

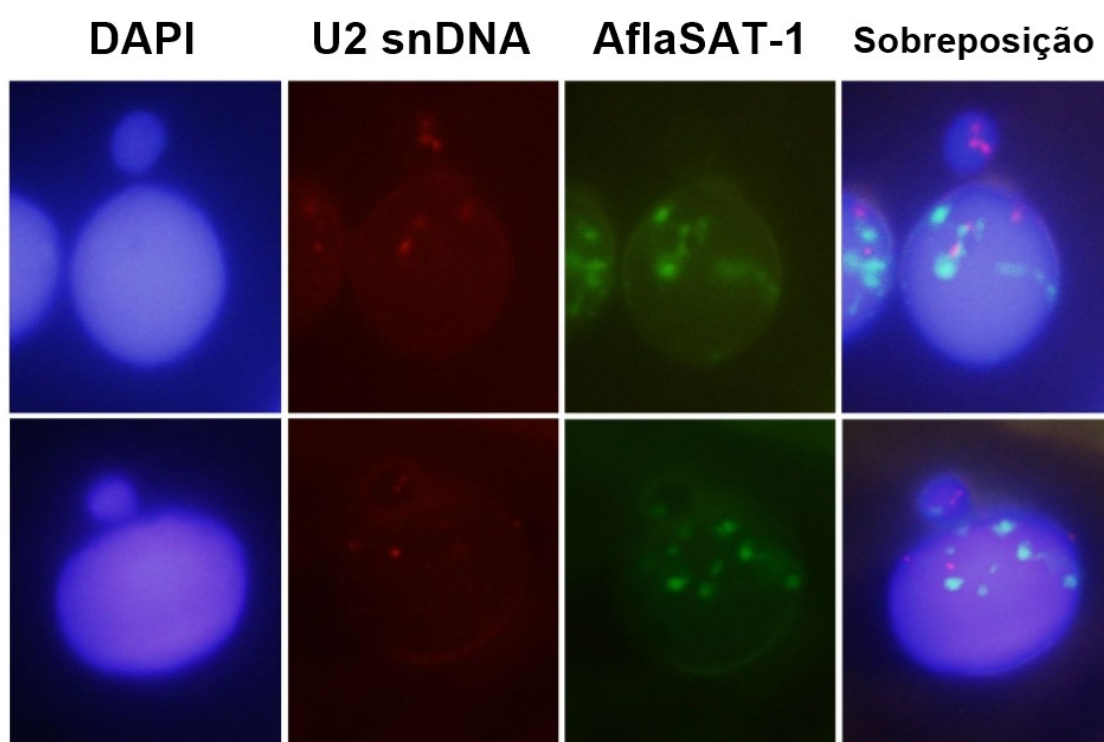
(B-) Duas espermátides não portadoras de cromossomo B com uma marca do par de cromossomos 1. (B+) Espermátide portadora de um cromossomo B exibindo cinco marcas (quatro do cromossomo B e uma do par 1). (B++) Espermátide com nove marcas (oito dos cromossomos 2B e uma do par 1).

4.4 Expulsão de cromossomos B em microespermátides

A contagem inicial conduzida pela observação de micro- e normais espermátides em machos com e sem cromossomos B mostrou que os machos portadores de B formaram mais microespermátides (0B t = 31, 1B t = 63 e 2B t = 62) do que machos 0B. Em relação à presença de cromossomos B nas microespermátides nos machos portadores de B, observou-se que um maior número de microespermátides possuía cromossomos B (81,6%) e o teste χ^2 apresentou a mesma tendência de formar microespermátides contendo cromossomo B em machos 1B e 2B com valor de p igual a 0,2314. Na maioria dos casos de microespermátides com cromossomo B (100 de 103 microespermátides), parecem não ter cromossomos A, como sugerido pela ausência do satDNA AflaSAT-1, que mostra a localização pericentromérica em cromossomos A (Figura 4). Isso indica uma tendência significativa de eliminação preferencial do cromossomo B. Mais do que isso, preservando o complemento A. Caracterizando assim, muito

provavelmente, um mecanismo de defesa do genoma hospedeiro. Isso responde a sugestão de Cabrero et al. (2017) analisar essas microespermátides com sondas mais precisas. Estudos que podem aprofundar essa questão podem ser realizados investigando o citoesqueleto dessas espermátides e a partir de outras sondas, buscando entender os mecanismos que levam a esse descarte do cromossomo B e quais partes desse cromossomo são descartadas.

Figura 4 - Preparações por FISH com sondas U2 snDNA e AflaSAT-1 em espermátides arredondadas de *A. flavolineata*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em vermelho, U2 snDNA mostrando cromossomos B presentes na microespermátide. Em verde, o DNA satélite centromérico AflaSAT-1 mostrando a ausência ou presença do sinal na microespermátide.

5. Conclusão

Nossos dados revelaram a eliminação do cromossomo B durante a meiose em machos 2B implicando a perda de 23% dos cromossomos B dos espermatozóides. Isso poderia representar um mecanismo defensivo do genoma do hospedeiro para evitar o acúmulo excessivo de DNA extra, dado que os cromossomos B nesta espécie são realmente grandes. Além disso, a eliminação do cromossomo B foi corroborada pela presença do cromossomo B em 81,6% das micro-espermátides que, na maioria dos casos (100 de 103 microespermátides), parecem não ter cromossomos A, como evidenciado pela ausência do DNAsat AflSat-1, que mostra a localização pericentromérica em cromossomos A. Estes dados sugerem uma possível expulsão preferencial de cromossomos B a partir da formação de microespermátides. Esta é a primeira vez em que se documenta a expulsão preferencial de um cromossomo B, sugerindo que as células podem ter mecanismos específicos para eliminação deste elemento e preservação do genoma A.

6. Referências

- AMOS, A.; DOVER, G. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma**, v. 81, n. 5, p. 673-690, 1981.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, v. 73, n. 3, p. 328-335, 1994.
- BIDAU, J. Effects on cytokinesis and sperm formation of a B-isochromosome in *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acridinae, Acrididae). **Caryologia**, v. 39, n. 2, p. 165-177, 1986.
- BOUGOURD S.M.; PLOWMAN A.B.; PONSFORD N.R. et al. The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In: BRANDHAM P.E.; BENNET M.D. (Eds.) **Kew Chromosome Conference IV**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995, 21–34.
- BROCKHOUSE, C.; BASS, J. A. B.; FERADAY, R. M.; STRAUS, N. A. Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). **Genome**, v. 32, n. 4, p. 516-521, 1989.
- 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. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 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.; MARTÍN-PECIÑA, M.; RUIZ-RUANO, F. J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M. Post-meiotic B chromosome expulsion, during spermiogenesis, in two grasshopper species. **Chromosoma**, v. 126, n. 5, p. 633-644, 2017.
- CABRERO, J.; VISERAS, E.; CAMACHO, J. P. M. The B-chromosomes of *Locusta migratoria* I. Detection of negative correlation between mean chiasma frequency and the rate of accumulation of the B's; a reanalysis of the available data about the transmission of these B-chromosomes. **Genetica**, v. 64, n. 3, p. 155-164, 1984.
- CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: GREGORY, T.R. (Ed.) **The evolution of the genome**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 223–86.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.

CAMACHO, J. P. M. et al. Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **The American Naturalist**, v. 149, n. 6, p. 1030-1050, 1997.

CARCHILAN, M.; KUMKE, K.; MIKOLAJEWSKI, S.; HOUBEN, A. Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. **Chromosoma**, v. 118, n. 5, p. 607, 2009.

CAVALLARO, Z. I. et al. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. **Chromosome Research**, v. 8, n. 7, p. 627-634, 2000.

COVERT, S. F. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. **Current genetics**, v. 33, n. 5, p. 311-319, 1998.

DARLINGTON, C. D. **Evolution of genetic systems**. Evolution of genetic systems. Oliver & Boyd, Edinburgh & London, 1958. 265p.

DOVER, G. Molecular drive. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 11, p. 587-589, 2002.

FERRETTI, A. B. S. M. **DNA ribossomal 45S no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Acrididae) : organização cromossômica**. 2016. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2016.

GREEN, D. M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma**, v. 97, n. 1, p. 55-70, 1988.

GREEN, D. M. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**, v. 33, n. 6, p. 818-824, 1990.

HÅKANSSON, A. Überzählige Chromosomen in einer Rasse von *Godetia nutans* Hiorth. **Bot Notiser**, v. 2, p. 1-19, 1945.

HÅKANSSON, A. Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. **Hereditas**, v. 34, n. 12, p. 35-59, 1948.

HENRIQUES-GIL, N.; SANTOS, J. L.; ARANA, P. Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, v. 89, n. 4, p. 290-293, 1984.

HERRERA, J. A. et al. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v. 76, n. 6, p. 633, 1996.

HEWITT, G. M. Variable transmission rates of a B-chromosome in *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.)(Acrididae: Orthoptera). **Chromosoma**, v. 40, n. 1, p. 83-106, 1973.

HEWITT, G. M. Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmekotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). **Chromosoma**, v. 56, n. 4, p. 381-391, 1976.

HEWITT, G. M.; EAST, T. M.; SHAW, M. W. Sperm dysfunction produced by B-chromosomes in the grasshopper *Myrmekotettix maculatus*. **Heredity**, v. 58, n. 1, p. 59, 1987.

HOUBEN, A. et al. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 467-478, 2014.

HUANG, W.; DAO, Y.; ZHAO, X.; WEIWEI, J. B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 88, 2016.

JONES, R. N. Transmission and drive involving parasitic b chromosomes. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 388, 2018.

JONES, R. N. New species with B chromosomes discovered since 1980. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 263-281, 2017.

JONES, N; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. **Trends in plant science**, v. 8, n. 9, p. 417-423, 2003.

JONES, R. N. Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. **New Phytologist**, p. 411-434, 1995.

JONES, R. N. B-chromosome drive. **The American Naturalist**, v. 137, n. 3, p. 430-442, 1991.

JONES, R. N. Are B chromosomes selfish? In: CAVALIER-SMITH, T. (Ed.) **The Evolution of Genome Size**. London: Wiley, 1985. p. 397-425.

JONES, R. N.; REES, H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982. 266p.

KIMURA, M; KAYANO, H. The maintenance of supernumerary chromosomes in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. **Genetics**, v. 46, n. 12, p. 1699, 1961.

KUWADA, Y. Ueber die Chromosomenzahl von *Zea Mays* L. **Shokubutsugaku Zasshi**, v. 29, n. 342, p. 83-89, 1915.

LAMB, J. C.; RIDDLE, N. C.; CHENG, Y. M.; THEURI, J.; BIRCHLER, J. A. Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. **Chromosome research**, v. 15, n. 3, p. 383-398, 2007.

LÓPEZ-LEÓN, M. D. et al. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. **Cytogenetic and genome research**, v. 121, n. 3-4, p. 260-265, 2008.

LÓPEZ-LEÓN, M. D. et al. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, v. 2, n. 2, p. 87-92, 1994.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; PARDO, M. C.; VISERAS, E.; CAMACHO, J. P. M.; SANTOS, J. L. Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). **Heredity**, v. 71, n. 4, p. 352, 1993.

LORAY, M. A.; REMIS, M. I.; VILARDI, J. C. Parallel polymorphisms for supernumerary heterochromatin in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera). **Genetica**, v. 84, n. 3, p. 155-163, 1991.

LORETO, E. L. S.; CARARETO, C. M. A.; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 545, 2008.

MENEZES-DE-CARVALHO, N. et al. High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Molecular genetics and genomics**, v. 290, n. 5, p. 1787-1792, 2015.

MIAO, V. P.; COVERT, S. F.; VANETTEN, H. D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**, v. 254, n. 5039, p. 1773-1776, 1991.

MILANI, D. et al. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC genetics**, v. 18, n. 1, p. 81, 2017a.

MILANI, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. The U2 snDNA is a useful marker for B chromosome detection and frequency estimation in the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 151, n. 1, p. 36-40, 2017b.

MILANI, D. **Organização de DNAs microssatélites nos cromossomos do gafanhoto *Abracris flavolineata*, com ênfase em cromossomos supranumerários**. 2015. 30 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2014.

MÜNTZING, A. Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. I. Isofragments produced by misdivision. **Hereditas**, v. 30, p. 231-248, 1944.

MÜNTZING, A. Accessory chromosomes in *Poa alpina*. **Heredity**, v. 2, p. 49-61, 1948.

NUR, U. Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. **Chromosoma**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 1969.

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, n. 4851, p. 512, 1988.

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

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. et al. Chromosomal mapping of two Mariner-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) reveals enrichment in euchromatin. **EJE**, v. 111, n. 3, p. 329-334, 2014.

PARKER, J. S. et al. Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula. **Heredity**, v. 67, n. 3, p. 287, 1991.

PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 1069-1073, 2001.

PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 243, 1970.

PINKEL, D.; LANDEGENT, 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**, v. 85, n. 23, p. 9138-9142, 1988.

PLOWMAN, A. B.; BOUGOURD, S. M. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. **Heredity**, v. 72, n. 6, p. 587, 1994.

POYATO, I. **Dinámica espacial y temporal de los cromosomas b del saltamontes *eyprepcnemis plorans***. 2010. 331 f. Tese de Doutorado. Universidad de Granada, Granada, 2010.

RANDOLPH, L. A. Types of supernumerary chromosomes in maize. **Anatomical Record**, v. 41, p. 102, 1928.

RUFAS, J. S.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J.; SUJA, J. A.; VEGA, C. G. D. L. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. **Genome**, v. 29, n. 5, p. 706-712, 1987.

RUTISHAUSER, A.; ROTH LISBERGER, E. Chromosomes Today. In: **Proc.** 1966. p. 28.

SCHMID, M.; ZIEGLER, C. G.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; SCHARTL, M. Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. **Chromosome Research**, v. 14, n. 3, p. 231-242, 2006.

SHAW, M. W. et al. B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next?. **Oxford surveys in evolutionary biology**, v. 7, p. 197-223, 1990.

SILVA, M. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences

by fluorescence in situ hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). **Chromosome Research**, v. 6, p. 455-462, 1998.

SUJA, J. A.; VEGA, C. G.; RUFAS, J. S. Mechanisms promoting the appearance of abnormal spermatids in B-carrier individuals of (Orthoptera). **Genome**, v. 32, n. 1, p. 64-71, 1989.

SUJA, J. A.; VEGA, C. G. D. L.; RUFAS, J. S. Meiotic stability of B chromosomes and production of macrospermatids in *Aiolopus strepens* (Orthoptera: Acrididae). **Genome**, v. 29, n. 1, p. 5-10, 1987.

TERUEL, M. et al. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chromosoma**, v. 119, n. 2, p. 217-225, 2010.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; ALCHE, J. D.; CAMACHO, J. P. M. Abnormal spermatid formation in the presence of the parasitic B24 chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Sexual Development**, v. 3, n. 5, p. 284-289, 2009.

VISERAS, E. et al. Relationship between mitotic instability and accumulation of B chromosomes in males and females of *Locusta migratoria*. **Genome**, v. 33, n. 1, p. 23-29, 1990.

WERREN, J. H. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. The **American Naturalist**, v. 137, n. 3, p. 392-402, 1991.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. London: Cambridge University Press, 1973. 468 p.

WILSON, E. B. The case of *Anasa tristis*. **Science**, v. 25, n. 631, p. 191-193, 1907.

WOLF, K. W.; MERTL, H. G.; TRAUT, W. Structure, mitotic and meiotic behaviour, and stability of centromere-like elements devoid of chromosome arms in the fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). **Chromosoma**, v. 101, n. 2, p. 99-108, 1991.

WURSTER-HILL, D. H.; WARD, O. G.; DAVIS, B. H.; PARK, J. P.; MOYZIS, R. K.; MEYNE, J. Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 49, n. 4, p. 278-281, 1988.

ZURITA, S. et al. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. **Evolution**, v. 52, n. 1, p. 274-277, 1998.