
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIOGO MILANI

**Organização de DNAs microssatélites nos
cromossomos do gafanhoto *Abracris
flavolineata*, com ênfase em cromossomos
supranumerários**



Rio Claro
2015

DIOGO MILANI

Organização de DNAs microssatélites nos cromossomos do gafanhoto
Abracris flavolineata, com ênfase em cromossomos supranumerários

Orientador: PROF. DR. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO

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

Rio Claro
2015

591.15 Milani, Diogo
M637o Organização de DNAs microssatélites nos cromossomos
do gafanhoto *Abracris flavolineata*, com ênfase em
cromossomos supranumerários / Diogo Milani. - Rio Claro,
2015
30 f. : il., figs.

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

1. Genética animal. 2. Citogenética. 3. DNAs repetitivos.
I. Título.

NOTA

Esta monografia é apresentada de acordo com o formato de artigo de revista científica seguindo restritamente todas as normas de apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso – TCC encontradas no Regulamento de entrega de TCC (item 1., sub-item 1.3.) dos Cursos de Graduação do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro.

O artigo científico no qual se baseia esta monografia encontra-se no formato original publicado na revista online PLoS ONE, intitulado: “Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes” com autoria de Diogo Milani e Diogo C Cabral-de-Mello, PLoS ONE 9(5): e97956. doi:10.1371/journal.pone.0097956.

Resumo

Com o propósito de se obter um conhecimento aprofundado sobre DNAs repetitivos e sua organização nos cromossomos de gafanhotos, nós utilizamos a técnica citogenética de Hibridização in situ fluorescente (FISH) para o mapeamento da distribuição de dezesseis sequências de microssatélites, incluindo mono-, di-, tri- e tetra-nucleotídeos, nos cromossomos da espécie *Abracris flavolineata* (Acrididae), que comporta um cromossomo B (supranumerário). A FISH (Hibridização in situ fluorescente) revelou pelo menos dois padrões distintos: (i) sinais exclusivamente espalhados, e (ii) sinais espalhados e específicos, formando blocos evidentes. O enriquecimento foi observado em ambas áreas de eucromatina e heterocromatina e também apenas o motivo (C)₃₀ apresentou ausência na heterocromatina. Os cromossomos A e B se apresentaram enriquecidos com todos os elementos mapeados, sendo observado para o cromossomo a presença de blocos mais distintivos para (GA)₁₅ e (GAG)₁₀. Para o complemento A blocos distintos foram observados para (A)₃₀, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀ e (GATA)₈. Estes resultados revelaram um intenso espalhamento dos microssatélites no genoma de *Abracris flavolineata* independentemente de enriquecimento de A+T ou G+C de cada uma das sequências. Os dados indicam que os microssatélites compõem o cromossomo B e que poderiam estar envolvidos na evolução deste elemento na espécie em estudo, embora nenhuma relação específica com qualquer cromossomo A tenha sido observado para discutir sobre sua origem. A análise sistemática apresentada neste trabalho contribui para o conhecimento sobre DNAs repetitivos e sua organização nos cromossomos dos gafanhotos, incluindo os cromossomos B.

Palavras-chaves: citogenética, DNAs repetitivos, cromossomos supernumerários, repetições em tandem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. DNAs repetitivos: Características gerais	5
1.2. Cromossomos B e DNAs repetitivos em gafanhotos	8
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. REFERÊNCIAS	22
ANEXO	30

1. Introdução

1.1. DNAs repetitivos: Características gerais

Os genomas eucarióticos apresentam ampla variabilidade por serem compostos de diferentes quantidades de DNAs repetitivos, constituídos por distintos grupos (CHARLESWORTH et al., 1994; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012). Esses elementos repetitivos são basicamente representados pelas famílias multigênicas, DNAs satélites, microssatélites e minissatélites e elementos de transposição (transposons e retrotransposons). Dentre todos estes grupos, essencialmente, as famílias multigênicas estão envolvidas na codificação de importantes proteínas e RNAs que atuam na organização e metabolismo celular. Além disso, os DNAs repetitivos estão envolvidos na formação da heterocromatina e em processos de regulação gênica (SHAPIRO e STERNBERG, 2005; BIÉMONT e VIEIRA, 2006; FESCHOTTE e PRITHAM, 2007), organização e funcionalidade dos centrômeros, telômeros, perfeita segregação cromossômica, regulação gênica, reparo e replicação do DNA e diferenciação dos cromossomos sexuais (ANLEITNER e HAYMER, 1992; KRAEMER e SCHMID, 1993; MESSIER et al., 1996; MARTINS, 2007; LÓPEZ-FLORES e GARRIDO-RAMOS, 2012).

As famílias multigênicas são sequências de DNA (genes) com notável similaridade estrutural e funcional, sendo descendentes de um gene ancestral comum (NEI e ROONEY, 2005). Dentre estas sequências são exemplos bastante conhecidos os genes de RNAs ribossomais (RNAr) e genes codificadores de proteínas histônicas. Além destes, podem ser citados os genes da proteína de choque térmico em *Drosophila melanogaster* e *Eypropecnemis plorans* (NEI e ROONEY, 2005; TERUEL et al., 2011), os genes MHC e imunoglobulinas em vertebrados (NEI et al., 1997), genes de receptores olfativos em mamíferos (WHINNETT e MUNDY, 2003; NIIMURA e NEI, 2003), genes de ubiquitina em eucariotos (NEI et al., 2000), e muitos outros. Estas famílias gênicas podem ocorrer em múltiplas cópias no genoma, como os genes de RNAr, RNAsn (*small nuclear RNA*) e histonas, sendo organizados em tandem ou dispersos pelo genoma.

Os DNA satélites são compostos por sequências altamente repetitivas com ampla variabilidade organizadas em tandem com diferentes números de cópias nos

genomas dos eucariotos, podendo variar entre 1.000 e mais de 100.000 cópias de uma unidade de repetição geralmente com 100-300 pb. Essas sequências são organizadas como grandes aglomerados, principalmente nas regiões centromérica e telomérica dos cromossomos, e são o principal componente da heterocromatina (JOHN e MIKLOS, 1979; CHARLESWORTH et al., 1994; UGARKOVÍČ e PLOHL, 2002; PALOMEQUE e LORITE, 2008). Famílias de DNA satélite podem corresponder a 0-66% de determinados genomas de mamíferos e a sua composição e número de famílias não relacionadas podem variar muito (BERIDZE, 1986). Diferentes espécies geralmente apresentam uma divergência entre as famílias de DNA satélite como um resultado de mecanismos de evolução em concerto (ARNHEIM, 1983), conduzindo a sequências de DNAs satélites espécie-específicas.

Os minissatélites incluem todas as repetições em tandem que não sejam suficientemente grande para serem incluídas como uma repetição satélite, nem suficientemente pequena para ser considerada uma sequência microssatélite (MARTINS, 2007). Apresentam variação de tamanho de 10-100 pares de base (pb) e encontram-se dispersas por todo o genoma e agrupadas perto do telômero com variação no número de unidades de repetição (VNTR). Os minissatélites são encontrados nos mais distintos grupos de eucariotos, desde leveduras, plantas e animais, sendo uma classe de DNA repetitivo comum nos genomas eucariotos (JEFFREYS et al., 1985).

Os microssatélites ou SSRs (repetições de sequências simples) consistem em repetições em tandem de pequenas sequências de DNA com um a cinco ou seis bases de nucleotídeos por unidade de repetição intercalados no genoma eucariótico (TAUTZ e RENZ, 1984; ELLEGREN, 2004), podendo estar presentes em regiões cromossômicas eucromáticas como podem estar associados com a heterocromatina constitutiva. Dentre os exemplos de microssatélites, podem ser citadas as distintas sequências de DNA telomérico (SCHLÖTTERER, 2000). Os microssatélites possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de mutação nestes locos por geração (LI et al., 2002). No entanto, são flanqueados por sequências únicas e por isso podem ser amplificados através de PCR, o que faz deles ótimos marcadores moleculares. Dois mecanismos de mutação que dependem de condições do ambiente podem ser invocados para explicar essa taxa de mutação. O primeiro envolve “DNA slippage” durante a replicação de DNA (TACHIDA e IIZUKA,

1992), e o segundo envolve recombinação entre as fitas não homólogas de DNA (HARDING et al., 1992).

Os elementos transponíveis são diferenciados das outras sequências repetitivas presentes nos genomas eucariotos simplesmente por sua capacidade de transposição/movimentação para distintas regiões, podendo gerar novas cópias de si mesmo. Grande parte dos diversos elementos repetitivos são originados dos elementos transponíveis e os mesmos representam uma grande porção dos genomas. Diversas famílias destes elementos já foram identificadas nos genomas, podendo ocorrer em espécies não relacionadas ou presentes apenas em grupos específicos (BIÉMONT e VIEIRA, 2006; FESCHOTTE e PRITHAM, 2007, WICKER et al., 2007). Em humanos, por exemplo, TEs (elementos transponíveis) representam aproximadamente 45% de todo genoma (LANDER et al., 2001), mas podem alcançar mais de 80% em algumas plantas, ou também apenas constituindo em 15% do genoma de *D. melanogaster* (VIEIRA et al., 1999).

Os elementos móveis (transposição) são classificados em Classe I (retrotransposons), apresentando RNA como intermediário, e Classe II (transposons sensu stricto), que se move diretamente como DNA (WICKER et al., 2007). Esses dois tipos são classificados em ordens incluindo diferentes superfamílias com base na estratégia de replicação. Os retrotransposons incluem LTR (repetições terminais longas) e outros sem essas repetições (não-LTR), conhecidos como LINES (elementos nucleares com espaçamento longos), que são considerados como os mais dispersos TEs eucarióticos (VITTE e BENNETZEN, 2006). Outro tipo caracterizado como transposon de DNA com mecanismos de transposição não conhecidos são agrupados em elementos MITE (miniaturas invertidas de elementos de transposição) (WESSLER et al., 1995). O comportamento replicativo de TE permite que estes se acumulem no genoma, onde são considerados basicamente como parasitas genômicos ou DNA egoísta. Mas, sua contribuição para o tamanho do genoma, seu papel na evolução de outras sequências repetitivas e sua capacidade de mutação genética e cromossômica, os tornaram uma importante força que contribui na construção e organização do genoma eucarioto (KIDWELL, 2002; FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). A frequência e dinâmica de longo prazo de TEs nas populações podem ser explicadas pelo equilíbrio entre a

habilidade de auto-propagação desses elementos parasitas e a eliminação da cópia gerada pelos efeitos deletérios associados à inativação dos genes onde eles estão inseridos, como também nas consequências negativas da recombinação ectópica e rearranjos cromossômicos que eles promovem (CHARLESWORTH et al., 1994; KIDWELL e LISH, 1997). Elementos transponíveis se encontram principalmente em regiões heterocromáticas (DIMITRI et al., 2003) onde a existência de baixa densidade e supressão de genes ou baixa recombinação possa suavizar seus efeitos deletérios. No entanto, regiões eucromáticas, sendo algumas geneticamente ativas, são também alvos desses elementos (REBUZZINI et al., 2009; MONTIEL et al., 2012).

1.2. Cromossomos B e DNAs repetitivos em gafanhotos

Os cromossomos B ou elementos supranumerários foram os primeiros elementos egoístas descobertos (WILSON, 1907) e foram definidos por Jones and Rees (1982) como cromossomos não homólogos aos cromossomos do complemento normal (complemento A) que não apresentam capacidade de recombinação com os mesmos e são completamente dispensáveis. Na primeira conferência realizada sobre cromossomos B, Camacho e Parker (1993) definiram que estes elementos são “cromossomos dispensáveis presentes em alguns indivíduos de algumas populações de algumas espécies de plantas e animais, que surgiram provavelmente dos cromossomos A, entretanto seguem seu próprio caminho evolutivo, uma vez que não se recombina com o genoma A” (BEUKEBOOM, 1994). Os cromossomos B também se caracterizam 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).

Desde sua descoberta foi relatada a presença de cromossomos Bs em cerca de 15% das espécies de eucariotos, correspondendo a 1.300 espécies de plantas, 500 animais e 10 fungos, tendo sido mais frequentes em alguns grupos, tais como ortópteros, peixes, gramíneas e liliáceas (revisado por CAMACHO, 2005).

Vários modelos foram propostos para explicar a persistência dos cromossomos B nas populações. Segundo Camacho et al. (2000), o modelo que se encontra na maioria dos cromossomos B estudados é o modelo parasita-egoísta

(ÖSTERGREN, 1945; JONES, 1995; SHAW e HEWITT, 1990), que 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. Camacho et al. (2003) sugerem que o genoma do hospedeiro pode mostrar diferentes níveis de tolerância, que poderia ser visto como um genótipo exposto a diferentes graus de parasitismo (número de cromossomos B). Um genótipo considerado tolerante poderia ser capaz de portar cromossomos B com uma redução da eficiência biológica menor que a dos indivíduos não tolerantes. Uma vez que o cromossomo B chega a ser mais ou menos estável, este pode 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).

Os cromossomos B podem ter tamanho equivalente ao dos cromossomos do complemento A, embora existam exemplos de cromossomos B maiores que os A, e também menores, como os mini-cromossomos B descritos em várias espécies. O tamanho dos cromossomos Bs interferem diretamente em sua estabilidade ao longo das divisões celulares, sendo os grandes ou com tamanhos medianos mais estáveis comparados aos Bs diminutos (CAMACHO, 2005). Quanto à composição a maioria dos cromossomos B é composta de elementos repetitivos ou heterocromáticos, entretanto, alguns poucos genes de cópia única têm sido descritos nesses cromossomos (GRAPHODATSKY et al., 2005), além das 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).

Dentre os elementos de DNA repetitivos mais encontrados nos cromossomos B destacam-se genes ribossomais, DNAs satélites e elementos transponíveis (CAMACHO et al., 2000, CAMACHO, 2005). Distintos DNAs satélites e elementos transponíveis foram descritos em diversos cromossomos B de diferentes espécies, tais como *Epepocrinemis plorans* (Orthoptera), *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 A (NUR et al., 1988; JAMILENA et al., 1994; GUTKNECHT et al.,

1995; PUERTAS, 2002; LÓPEZ-LEÓN et al., 2008, MARQUES et al., 2012). Em *Z. mays* e em *Secale cereale*, os cromossomos B compartilham sequências de DNA repetitivos com os cromossomos A, além de serem observadas outras sequências de DNA satélites específicas dos cromossomos B (PUERTAS, 2002).

O acúmulo de elementos repetitivos nos cromossomos B está diretamente associado a sua natureza heterocromática e ausência de recombinação com os elementos A (BEUKEBOOM, 1994; CAMACHO et al., 2000). A presença de transposons estão sendo detectados em vários cromossomos B (CAMACHO, 2005), podendo, além de causar a inativação de genes, modificar a ordem e estrutura gênica e ocasionar a gradual degeneração deste cromossomo (CAMACHO et al., 2000), bem como estar implicados em sua origem e evolução.

Dentre os ortópteros a presença de cromossomos B foi relatada em 191 espécies, destacando-se a superfamília Acridoidea com cerca de 14,6% das espécies, sendo os mesmos prevalentes em espécies com cromossomos acrocêntricos (PALESTIS et al., 2010). Embora seja bastante frequente a presença de cromossomos B nos gafanhotos, análises mais aprofundadas em relação à composição são basicamente restritas às espécies *E. plorans*, *L. migratoria* e espécies do gênero *Podisma*, além de alguns estudos em gafanhotos sul-americanos, tais como *Rhammatocerus brasiliensis*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Dichroplus pratensis* e *Abracris flavolineata* (BUENO et al., 2013; BUGROV et al., 2007; TERUEL et al., 2010; LÓPEZ-LEÓN et al., 1993; BAKKALI et al., 2001; CABRERO et al., 2003; LORETO et al., 2008; BIDAU, 1987).

Em *E. plorans*, espécie modelo para estudos de diversificação de cromossomos B, as sequências repetitivas de DNA têm sido bastante úteis em análises relativas à origem e diversificação das distintas variantes destes elementos. Nesta espécie, todas as células dos indivíduos apresentam o cromossomo B e mais de 50 variantes de cromossomos B foram observadas em distintas populações (LÓPEZ-LEÓN et al 1993, 2008; BAKKALI et al., 2001). O mapeamento físico cromossômico utilizando DNAr 18S e 5S e DNA satélite (180-bp) em representantes de distintas populações tem auxiliado a traçar a origem destes elementos nas populações desta espécie. Por exemplo, o mapeamento dos genes ribossomais e do DNA satélite 180-bp indica a origem múltipla e independente do cromossomo B em populações europeias (CABRERO et al., 2003). Além disso, o mapeamento do DNAr

5S indica a origem do cromossomo supranumerário a partir do menor elemento autossômico (S11) na população do Cáucaso (CABRERO et al., 2003), enquanto em outras populações, a origem a partir do cromossomo X foi relatada com o uso do DNAr 45S e DNA satélite (180-bp) como sonda (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994). Recentemente a pintura cromossômica com sondas totais obtidas dos cromossomos B24 e X indicou forte relação de compartilhamento de sequências entre estes cromossomos, além do compartilhamento de sequências com os blocos de heterocromatina nos autossomos, indicando provável origem intraespecífica deste elemento (TERUEL et al., 2009).

Além de *E. plorans* outras espécies de gafanhotos europeus têm sido utilizadas como modelo para análises de cromossomos supranumerários, tal como espécies do gênero *Podisma* e *Locusta migratoria*. Dentre estas análises realizadas destacam-se o mapeamento de genes repetitivos, tais como DNAr e genes de histona e pintura cromossômica dos B microdissectados, além do uso de alguns clones contendo DNAs repetitivos (BUGROV et al., 2007; TERUEL et al., 2010).

Em gafanhotos Sul-americanos a presença de cromossomos B com morfologia e heteropicnose similar a do cromossomo X tem sido registrada em distintas populações de *Rhammatocerus brasiliensis* e *Xyleus discoideus angulatus* (LORETO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Em *R. brasiliensis*, estudos de cromossomo B revelaram semelhança com alguns autossomos portadores de DNAr 5S mas não DNAr 45S, e também mostraram que o cromossomo X não apresenta ambas as famílias de DNAr (LORETO et al., 2008), indicando origem autossômica. Por outro lado, o DNAr 5S mapeado em todos os cromossomos do complemento padrão (exceto no par 11) e no cromossomo B, mostrou um resultado distinto das outras populações posteriormente analisadas. Além da dispersão do DNAr 5S no genoma de *R. brasiliensis* foram também observados múltiplos locais de genes H3 de histonas, sendo localizados nas mesmas regiões cromossômicas de DNAr 5S, incluindo a presença de gene H3 no cromossomo B (OLIVEIRA et al., 2011). Em *X. discoideus angulatus*, o DNAr 45S se mostrou ausente no cromossomo B, ao passo que o cromossomo X contém um dos dois agrupamentos 45S rDNA no genoma (LORETO et al., 2008), reforçando origem autossômica deste elemento. Na espécie de gafanhoto *Dichroplus pratensis* dois tipos distintos de cromossomos B foram

relatados (BIDAU, 1987), dos quais um deles apresenta ocorrência de DNAr 45S compartilhado com o par cromossômico 8 (BIDAU et al., 2004).

Embora uma significativa fração do genoma eucariótico seja composta por microssatélites, sua distribuição cromossômica foi abordada apenas em grupos específicos (CUADRADO E JOUVE, 2007, 2010; CUADRADO et al., 2008; KUBAT et al., 2008; SANTOS et al., 2010; POKORNÁ et al., 2011; KEJNOVSKY et al., 2013; MATSUBARA et al., 2013; TERCENIO et al., 2013). Além disso, os estudos que exploram a composição dos cromossomos B com distintas sequências repetitivas não investigam sistematicamente a ocorrência/distribuição de microssatélites (CUADRADO et al., 2008; MARQUES et al., 2012). Os gafanhotos possuem genomas enormes, podendo atingir cerca de 16 Gb, e isto poderia estar diretamente relacionado com a proliferação de DNAs repetitivos, como recentemente demonstrado pelo genoma sequenciado de *Locusta migratoria* (WANG et al., 2014), que revelou ser composto em 60% de DNAs repetitivos. No entanto, a organização de sequências repetitivas específicas, como os microssatélites, são pobremente conhecidas neste grupo de insetos, pelo qual o mapeamento cromossômico de (AG)₁₀ e (AC)₁₀ é restrito apenas em *E. plorans* e *Chorthippus* sp, respectivamente (CUADRADO et al., 2008).

Embora os estudos de cromossomos B em ortópteros sejam numerosos, trabalhos relacionados com mapeamento físico cromossômico visando elucidar os distintos padrões de origem e diversificação destes elementos são ainda escassos, principalmente em gafanhotos Sul-americanos. O isolamento e caracterização de distintas sequências de DNA serão úteis nas análises cromossômicas com enfoque em estudos de evolução, origem e diversificação de supranumerários em gafanhotos. As análises propostas neste projeto juntamente com os resultados já obtidos com outras classes de DNAs repetitivos, tais como famílias multigênicas, fração de DNA *C_{ot}-1* (BUENO et al., 2013) e elementos de transposição para a espécie *Abracris flavolineata* irão auxiliar no entendimento dos padrões de origem, organização molecular e evolução de cromossomos B na espécie alvo do estudo.

2. Objetivos

Aprofundar o conhecimento a respeito dos DNAs repetitivos e sua organização cromossômica, bem como sobre a composição/evolução do complemento A e de cromossomos B em gafanhotos através do mapeamento por FISH de diferentes sequências de DNAs microssatélites.

3. Materiais e métodos

Espécimes machos e fêmeas adultos de *Abracris flavolineata* foram coletados na região de Rio Claro e colocados em caixas de criação para fecundação e obtenção de posturas. Posteriormente, os embriões foram obtidos a partir da dissecação do ovo com cerca de 15 dias após a postura. Células mitóticas foram obtidas de embriões segundo o protocolo proposto por Webb et al. (1978) com pequenas modificações. Essas células foram utilizadas para experimentos de bandejamento-C de acordo com Summer (1972) e experimentos de FISH. Pelo menos 15 metáfases foram analisadas para descrever os padrões de distribuição dos microssatélites.

Foram utilizados dezesseis distintos microssatélites específicos como sondas marcados diretamente com Biotina na extremidade 5' (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante sua síntese em experimentos de FISH (Hibridização *in situ* fluorescente). Estes *repeats* incluíram, mono- (A)₃₀, (C)₃₀, di- (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅, (TA)₁₅, tri- (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (GAG)₁₀, (TAA)₁₀ e tetranucleotídeos (GACA)₄, (GATA)₈.

A FISH foi realizada utilizando basicamente o protocolo descrito por Pinkel et al. (1988) com pelo menos 300ng de DNA, com adaptações propostas por Cabral-de-Mello et al. (2010) e as sondas foram detectadas usando Streptavidina, Alexa Fluor® conjugado 488 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI (49, 6-diamidino-2-fenilindona) e montadas com meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

Os resultados foram observados no microscópio Olympus BX61 equipado com lâmpada fluorescente e filtros apropriados. As imagens foram fotografadas utilizando uma câmera digital resfriada DP70 em escala de cinza e posteriormente pseudocoloridas combinadas e otimizadas com brilho e contraste pelo programa Adobe Photoshop CS6.

4. Resultados e discussão

Esta etapa do trabalho está apresentada no referente manuscrito publicado na revista PLoS ONE.



Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes

Diogo Milani, Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello*

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

Abstract

With the aim of acquiring deeper knowledge about repetitive DNAs chromosomal organization in grasshoppers, we used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to map the distribution of 16 microsatellite repeats, including mono-, di-, tri- and tetra-nucleotides, in the chromosomes of the species *Abracris flavolineata* (Acrididae), which harbors B chromosome. FISH revealed two main patterns: (i) exclusively scattered signals, and (ii) scattered and specific signals, forming evident blocks. The enrichment was observed in both euchromatic and heterochromatic areas and only the motif (C)₃₀ was absent in heterochromatin. The A and B chromosomes were enriched with all the elements that were mapped, being observed in the B chromosome more distinctive blocks for (GA)₁₅ and (GAG)₁₀. For A complement distinctive blocks were noticed for (A)₃₀, (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀ and (GATA)₈. These results revealed an intense spreading of microsatellites in the *A. flavolineata* genome that was independent of the A+T or G+C enrichment in the repeats. The data indicate that the microsatellites compose the B chromosome and could be involved in the evolution of this element in this species, although no specific relationship with any A chromosome was observed to discuss about its origin. The systematic analysis presented here contributes to the knowledge of repetitive DNA chromosomal organization among grasshoppers including the B chromosomes.

Citation: Milani D, Cabral-de-Mello DC (2014) Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes. PLoS ONE 9(5): e97956. doi:10.1371/journal.pone.0097956

Editor: Andreas Houben, Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany

Received: January 29, 2014; **Accepted:** April 27, 2014; **Published:** May 28, 2014

Copyright: © 2014 Milani, Cabral-de-Mello. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2011/19481-3), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (475308/2011-5) and PROPE-UNESP. The scholarships of Milani D were granted by PIBIC/CNPq program (process number 27785). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mellodc@rc.unesp.br

Introduction

The accumulation of highly repetitive DNAs that are organized in tandem and dispersed is a common pattern in eukaryotic genomes [1–3]. Among tandem repeats, microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) are composed of short motifs (~6 bp) and constitute one of the most dynamic types of sequences; SSRs are abundant and can be located in specific chromosomal areas or widely scattered throughout euchromatic or heterochromatic areas [4–7]. In addition to other repetitive DNAs, such as transposable elements (TEs), satellite DNAs and multigene families, these sequences, have had a great impact on the organization and evolution of genomes [3,5,8–13].

One genome element that is characterized by the accumulation of repetitive DNAs are the B chromosomes (supernumerary or accessory chromosomes), which are dispensable elements that occur as polymorphism in addition to the standard karyotype in more than 2,000 eukaryotic species [14–16]. The close relationship between B chromosomes and repetitive DNAs has been demonstrated in some studies, revealing distinct classes of this genomic fraction, including transposons, retrotransposons, satellite DNA and multigene families. The accumulation of these repetitive

DNAs may have resulted from a lack of recombination and may have led to B chromosome species-specific evolution [14–20].

The occurrence of B chromosomes has been reported in 191 Orthoptera species and in approximately 14.6% of Acridoidea representatives; B chromosomes also prevail in species with acrocentric chromosomes [21]. Although prevalent in grasshoppers, the molecular content of B chromosomes and their relationship with A elements have only been extensively investigated by the chromosomal mapping of repetitive DNAs in a few species, mainly in *Eyprepocnemis plorans* and to a lesser extent in *Locusta migratoria*, *Abracris flavolineata*, *Rhammatocerus brasiliensis*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Dichroplus pratensis*, and species of *Podisma*. In these species, the mapping of repetitive DNAs has revealed variability and the presence of distinct sequences in B chromosomes, such as satellite DNA, rDNAs, histone genes, U2 snDNA and a SCAR marker; these mapping efforts may inform hypotheses about the possible origins and evolution of these elements [22–37].

Although a significant fraction of the eukaryotic genome is composed of microsatellites, their chromosomal distribution has been addressed only in specific groups (see for example [6,7,38–44]). Moreover, the studies that explore the composition of the B

chromosome with distinct repetitive sequences do not systematically investigate microsatellite occurrence/accumulation [38,45].

Grasshoppers possess large genomes and it could be directly related to the proliferation of repetitive DNAs, as recently demonstrated by genome sequencing of *Locusta migratoria* [46], that revealed ~60% of repetitive DNAs. On the other hand, the organization of specific repetitive sequences, like microsatellites, are poorly known in this insect group, with chromosomal mapping of (AG)₁₀ and (AC)₁₀ restrict to *E. plorans* and *Chorthippus* sp, respectively [38]. Here in order to obtain a deeper knowledge of repetitive DNAs chromosomal organization for standard complement and B chromosome composition/evolution in grasshoppers we mapped 16 distinct microsatellite motifs in the chromosomes of *Abracris flavolineata* (Acrididae: Ommatolampidinae), a species presenting 2n = 23,X0 (male) and 2n = 24,XX (female) and with occurrence of B chromosomes [37]. Our results revealed intense spreading of distinct motifs in A complement and B chromosome.

Materials and Methods

Cells bearing one B chromosome were obtained from embryos males (2n = 23,X0) or females (2n = 24,XX) following the protocol proposed by Webb et al. [47], with slight modifications. These cells were used in C-banding experiments according to Sumner [48] and in FISH experiments using microsatellites. At least 15 metaphase spreads were analyzed to describe the patterns of microsatellite distribution.

Specific microsatellites were labeled directly with Biotin during synthesis at the 5' end and were used as probes (Sigma, St. Louis, MO, USA). The microsatellites included mono-, di- tri- and tetra-nucleotides: (C)₃₀, (A)₃₀, (TA)₁₅, (CG)₁₅, (CA)₁₅, (GA)₁₅, (TAA)₁₀, (TAC)₁₀, (GAG)₁₀, (GAA)₁₀, (GAC)₁₀, (CAA)₁₀, (CAC)₁₀, (CGG)₁₀, (GACA)₄, and (GATA)₈. The FISH experiments were performed with at least 300 ng of DNA according to the protocol proposed by Pinkel et al. [49] and with modifications reported by Cabral-de-Mello et al. [50]. The probes were detected using Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen, San Diego, CA, USA), and all preparations were counterstained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) and mounted in Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). The results were observed using an Olympus microscope BX61 that was equipped with a fluorescence lamp and the appropriate filters. Images were photographed using a DP70 cooled digital camera in grayscale, and the images were pseudocolored and posteriorly combined and optimized for brightness and contrast with Adobe Photoshop CS6.

Results

C-positive blocks that correspond to constitutive heterochromatin were observed in pericentromeric regions that extended to the short arms in the A complement. The B chromosome was euchromatic, as previously described by Bueno et al. [37] (Figure 1).

Two distinct general distribution patterns that depended on the microsatellite were observed by FISH: (i) exclusively scattered signals (Figure 2), and (ii) scattered and specific signals, forming evident blocks (Figure 3). Among the microsatellites with scattered distribution slight differences were observed for distribution with signals along the entire chromosomes for (TA)₁₅, (TAA)₁₀, (TAC)₁₀, (GAG)₁₀ and (GACA)₄ and restrict to euchromatin for (C)₃₀. Moreover the intensity of signals were distinct, being observed less intensity for (TAC)₁₀ in comparison to the other repeats (Figure 2). Regarding the microsatellites with scattered and specific signals some differences were also remarkable for the evident blocks, as follows: (i) only interstitial signals were observed

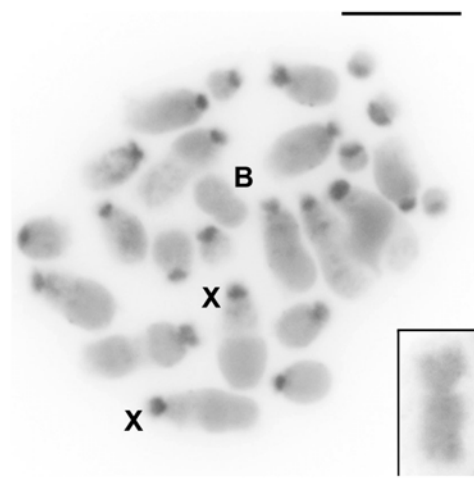


Figure 1. C-banding in embryo female mitotic metaphase of *Abracris flavolineata*. The X and B chromosomes are indicated. Note that the C-positive blocks in the centromeric regions extend to the short arms of the A chromosomes and the euchromatic nature of the B element. The inset highlights the euchromatic B chromosome. Bar = 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0097956.g001

for (A)₃₀ and (GAA)₁₀; (ii) interstitial and terminal blocks were noticed for (CG)₁₅, (CAA)₁₀ and (CAC)₁₀; (iii) interstitial, terminal and proximal blocks were noticed for (CA)₁₅, (GA)₁₅, (GATA)₈; (iv) mainly blocks in the short arms were evidenced for (CGG)₁₀; and finally (v) centromeric blocks, in some chromosomes extending to the short arms were observed for (GAC)₁₀ (Figure 3).

Concerning the B chromosome, in general the microsatellites were scattered along its entire extension. More evident blocks were observed only for (GA)₁₅, located in the centromeric and in the interstitial region of the long arm and for (GAC)₁₀, with centromeric block (Figure 3). The X chromosome showed more intense interstitial hybridization for (CA)₁₅, (CG)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀ and (CAA)₁₀. For (CGG)₁₀ and (GAC)₁₀ more intense signal were noted in the short arm and centromeric positions, respectively (Figure 3).

Discussion

This study provides the first systematic analysis for microsatellite repeats chromosomal mapping in a grasshopper species. On a broad scope, the results indicated that an intense spreading of mono-, di-, tri- and some tetra-nucleotides has occurred in the *A. flavolineata* genome, including similarly heterochromatic and euchromatic areas of the A complement and the B chromosome. The accumulation of microsatellites in eukaryotic genomes, in general, tends to vary and decrease from vertebrates and plants to fungi and invertebrates. It has also been suggested that the presence of highly repetitive simple sequences can correlate to genome size and in species distantly related the microsatellite quantity and genome size present correlation, as for example human, *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* [3,51–54]. For grasshoppers, a survey performed in *Chorthippus biguttulus* (Acrididae) with expected large genome revealed that the microsatellites are not more frequent, at least the di-nucleotides studied, than in other insect with smaller genomes. On the other hand, the repeat arrays are longer than in other insects and could reflect the genome size increasing [54]. Non-correlation of genome size and abundance of microsatellite was also documented in other insects, as in parasitic wasps that

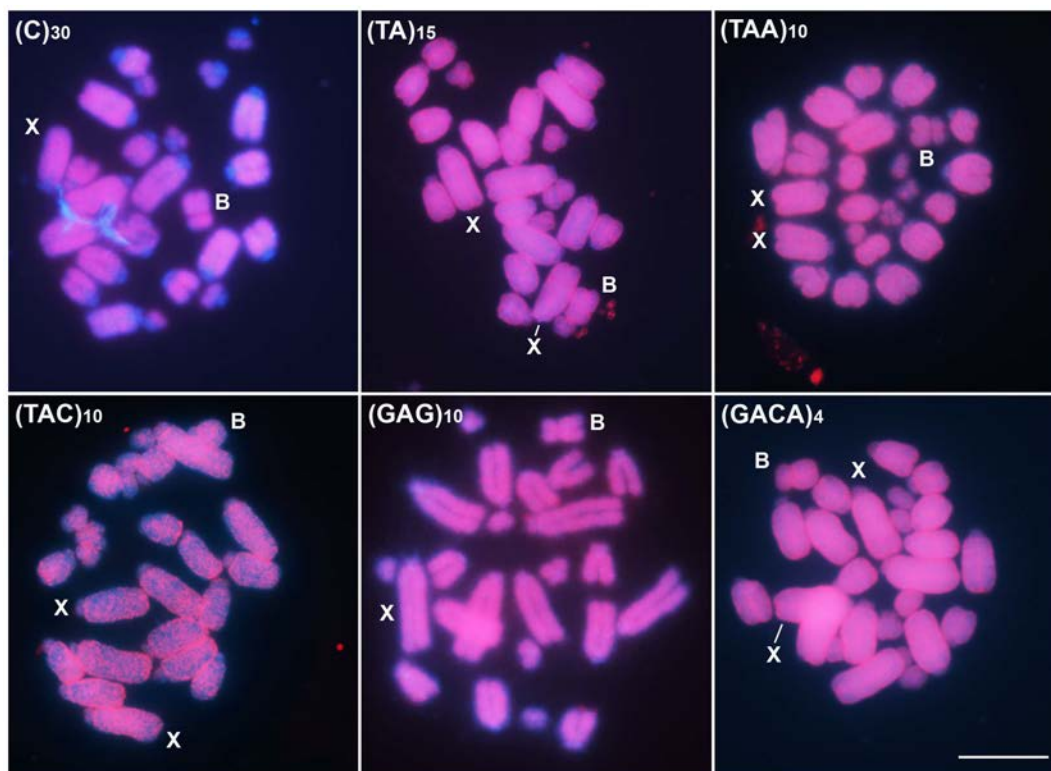


Figure 2. FISH mapping for six microsatellite motifs in embryo mitotic cells of *A. flavolineata* with scattered distribution. Each microsatellite is indicated in each image. The B and X chromosomes are pointed in each image and the sex of the embryo can be noticed by the occurrence of one (male X0) or two (female XX) X chromosomes. Note the absence of signals in the heterochromatic areas for (C)₃₀. Bar = 5 μm. doi:10.1371/journal.pone.0097956.g002

have more microsatellite density than *D. melanogaster*, although their genomes are comparable in size [55–57].

A remarkable distribution/spreading of microsatellites, such as that observed for most of the repeats described herein, has also been reported in other species for distinct motifs, such as in reptiles (*Eremias velox*), plants (*Solanum lycopersicum*, *Silene latifolia* and *Rumex acetosa*) and insects (*Drosophila melanogaster*), including the grasshopper species *Eyprepocnemis plorans* [38,39,41,42,58,59]. This wide spreading could be attributed to the activity of transposable elements that contain microsatellite sequences and, in some cases, are involved with microsatellites origin during genome integration of TEs [8,60–64]. In the case of *A. flavolineata*, the occurrence/spreading of some microsatellites in euchromatin resembles the distribution of two isolated *Mariner*-like transposable elements [65].

In contrast to intense and random distribution patterns, localized intense signals were observed for some microsatellites in *A. flavolineata*. Specific signals were observed in the chromosomes of the grasshopper *Chorthippus* sp for AC motif, and cases of non-random distribution for distinct repeats are well documented within and between *Drosophila melanogaster* chromosomes and in Triticeae plants [7,38]; these patterns depended on euchromatin, heterochromatin and centromeric areas. Moreover, in some other cases, the density of SSRs varied between chromosomes in the same genome, as observed for *A. flavolineata*. These results indicate that the organization of SSRs could form a particular pattern for each repeat, which could follow distinct trajectories of expansion, elimination and accumulation at intra- and inter-genomic levels through distinct molecular mechanisms, such as ectopic recombination, slippage replication and transposition [40,44,66–69].

Concerning the B chromosome, which has been poorly investigated in the context of microsatellite mapping, the (CAA)₁₀ repeat was reported to harbor these elements in rye (*Secale cereale*) [45], while the B chromosome of *E. plorans* did not revealed signals for (AG)₁₀, that is abundant in the A chromosomes of the species [38]. As, in general, a non-recombining element with A elements the B chromosomes could be a preferable site for SSR accumulation during its evolution; SSR accumulation may be involved in the differentiation process of these chromosomes, which would favor, for example, the rate of mutability. The mutability rate for microsatellites is very high (10^{-2} to 10^{-6} events per locus per generation) in relation to those at coding gene loci [8]; this high mutability could have been occurred in the A complement and B chromosome of *A. flavolineata*, which exhibit similar enrichment of most microsatellites that have been mapped here. In contrast, there is apparently a paucity of general pool of repetitive DNAs in the B chromosome of *A. flavolineata*, which was determined by using the *Cot*-1 DNA fraction (composed of highly and moderately repetitive DNAs) as a probe [37], indicating that not all types of repetitive DNAs have been isolated in this fraction, such as distinct microsatellites. The distinctive block for (GA)₁₅ observed in the long arm of the B chromosome in *A. flavolineata* indicate that after its origin through isochromosome formation [37] the arms probably have been experienced distinct accumulation of repetitive sequences, as also recently reported for a *Mariner*-like transposable element (*Afmar2*) [65].

Although we noted the spreading of SSRs in the non-recombining B chromosome it was, in general, not different from A chromosomes that present distinct degrees of recombination, e.g., recombining (autosomes) and less-recombining (X chromo-

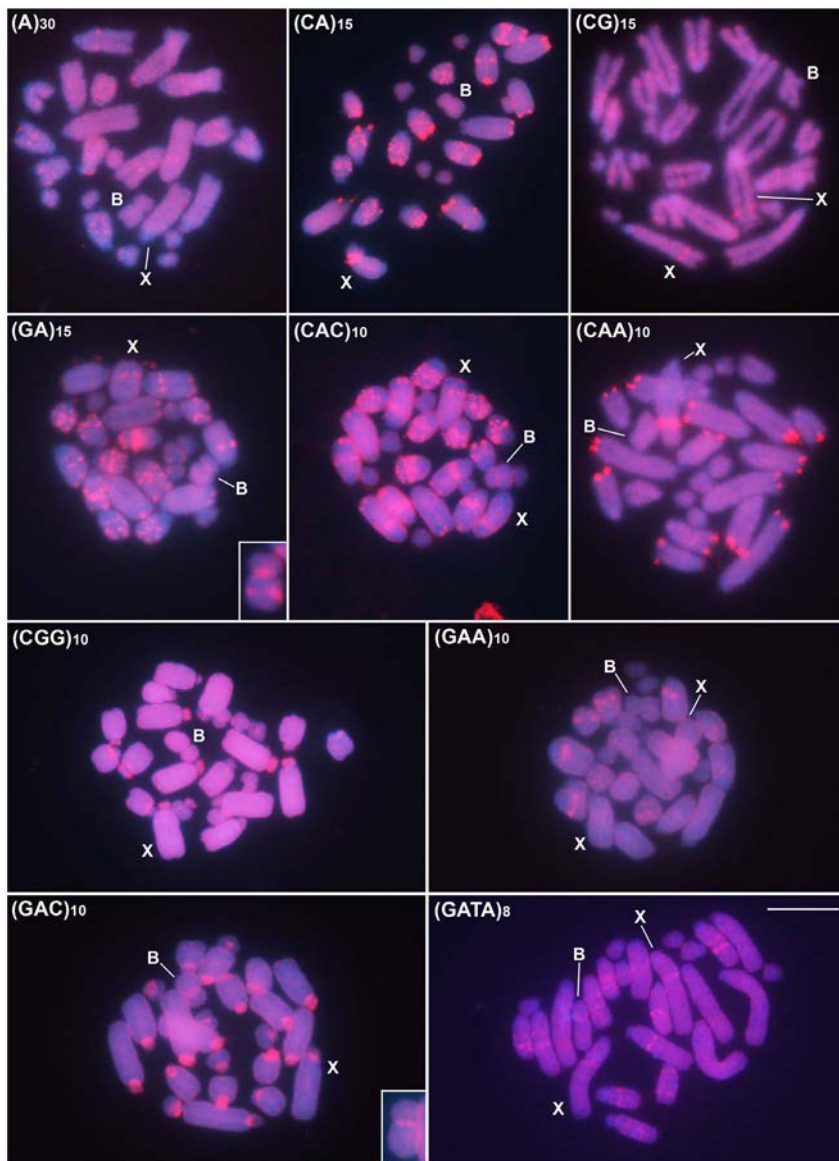


Figure 3. FISH performed using ten microsatellites as probes in embryo mitotic cells of *A. flavolineata* revealing distribution of repeats in distinct chromosomal regions. Each microsatellite is indicated in each image. The B and X chromosomes are pointed in each image and the sex of the embryo can be noticed by the occurrence of one (male X0) or two (female XX) X chromosomes. The insets highlight the B chromosome with probes for repeats with distinctive blocks. Bar = 5 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0097956.g003

some that recombine only in females). Furthermore, these differences, in general, were not observed for distinct chromosomal regions with distinct degree of recombination, such as euchromatin and heterochromatin. Such differences of microsatellite accumulation between different chromosomes with distinct degrees of recombination have been previously reported. For example, an accumulation of distinct microsatellites was observed in the young Y chromosome of *Rumex acetosa* [42]. Additionally, *Silene latifolia*, which has non-recombining genome regions, e.g., the Y chromosome, has also accumulated microsatellites in this chromosome [39]. The accumulation of microsatellites in sex chromosomes has also been reported in animals, such as for example in *Eremias velox* (lacertid lizard) [41], *Aprasia parapulchella* (Pygopodid lizard) [43] and *Semaprochilodus* (Prochilodontid fish) [44], suggesting a role for this type of sequence in sex chromosome

differentiation favored by the suppression of recombination among these elements.

Although the results of this study did not provide new insights regarding the specific origin of the B chromosome in *A. flavolineata*, proposed to be derived from pair one [37], our approach provided novel valuable primary data about the organization of distinct microsatellite sequences in grasshopper genomes, including the A complement and B chromosomes. Moreover, these data increase the knowledge of B chromosome composition in this insect group and in eukaryotes, indicating that microsatellites could play important role in B chromosome evolution. The next step should employ the use of this simple assay, i.e., FISH mapping of microsatellites, in other grasshopper species that bear B chromosomes to determine whether the spreading of these elements commonly occurs in this group and whether there is a correlation with the distribution of euchromatin/heterochromatin.

Acknowledgments

The authors are grateful to the anonymous reviewers for their substantial contributions.

References

- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220.
- Biémont C, Vieira C (2006) Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn* 7: 1–28.
- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nuc Acids Res* 12: 4127–4138.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365–371.
- Cuadrado A, Jouve N (2007) Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats within and between *Drosophila*, human and barley chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 119: 91–99.
- Cuadrado A, Cardoso M, Jouve N (2008) Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in *Triticaceae*: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenet Genome Res* 120: 210–219.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11: 2453–2465.
- Shapiro JA, Sternberg R (2004) Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev* 80: 1–24.
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39: 121–152.
- Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Ann Rev Genet* 41: 331–368.
- Cabrero J, Camacho JP (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16: 595–607.
- Montiel EE, Cabrero J, Camacho JP, López-León MD (2012) *Gypsy*, *RTE* and *Mariner* transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. *Genetica* 140: 365–74.
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: *The evolution of the genome* (Gregory TR, ed.): 223–286.
- Jones RN, Gonzalez-Sanchez M, Gonzalez-Garcia M, Vega JM, Puertas MJ (2008) Chromosomes with a life of their own. *Cytogenet Genome Res* 120: 265–280.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2013) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell Mol Life Sci* 71: 467–478.
- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: An imprecision of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* 73: 928–996.
- Jones RN (1995) B chromosomes in plants. *New Phytol* 131: 411–434.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 163–178.
- Jones N, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci* 8: 417–23.
- Palestis BG, Cabrero J, Trivers R, Camacho JPM (2010) Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. *Genetica* 138: 1181–1189.
- López-León MD, Neves N, Schwarzhacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, et al. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2: 87–92.
- López-León MD, Cabrero J, Dzyubenko VV, Bugrov AG, Karamysheva TV, et al. (2008) Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Gen Res* 121: 260–265.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, et al. (2003a) Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112: 207–211.
- Cabrero J, Perfectti F, Gómez R, Camacho JPM, López-León MD (2003b) Population variation in the A chromosome distribution of satellite DNA and ribosomal DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res* 11: 375–381.
- Bidau CJ, Rosato M, Martí DA (2004) FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distortion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). *Cytogenet Genome Res* 106: 295–301.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, Andreenkova OV, Rubtsov NB (2004) Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet Genome Res* 106: 284–288.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN, et al. (2007) DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res* 15: 315–325.
- Abdelaziz M, Teruel M, Chobanov D, Camacho JPM, Cabrero J (2007) Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DCCM. Performed the experiments: DM. Analyzed the data: DM DCCM. Contributed reagents/materials/analysis tools: DCCM. Wrote the paper: DM DCCM.

- grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. *Cytogenet Genome Res* 119: 143–146.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jiménez R, Camacho JPM (2007) Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet Genome Res* 119: 135–142.
- Loreto V, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM, Souza MJ (2008) Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Res* 16: 233–241.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, et al. (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Res* 17: 11–18.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Acosta MJ, Sánchez A, et al. (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenet Genome Res* 125: 286–291.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JP (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the *Locusta migratoria*. *Chromosoma* 119: 217–225.
- Muñoz-Pajares AJ, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM, et al. (2011) A Single, Recent Origin of the Accessory B Chromosome of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics* 187: 853–863.
- Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, et al. (2011) Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Mol Cytogenet* 4: 24.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PLoS ONE* 8: e66532.
- Cuadrado A, Jouve N (2010) Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma* 119: 495–503.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome* 51: 350–356.
- Santos J, Lluís Serra L, Solé E, Pascual M (2010) FISH mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species. *Chromosome Res* 18: 213–226.
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: 90.
- Kejnovský E, Michalovova M, Steflava P, Kejnovska I, Manzano S, et al. (2013) Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. *PLoS ONE* 8: e45519.
- Matsubara K, Knopp T, Sarre SD, Georges A, Ezaz T (2013) Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). *Mol Cytogenet* 6: 60.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Vicari MR, Farias IP, et al. (2013) Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Senapochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): A fish model for sex chromosome differentiation. *Sex Dev* 7: 325–333.
- Marques A, Klemme S, Guerra M, Houben A (2012) Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. *Molecular Cytogenetics* 5: 34.
- Wang, et al. (2014) The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nature communications* 5: 2957.
- Webb GC, White MJD, Contreras N, Cheney J (1978) Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formerly *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. *Chromosoma* 67: 309–339.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306.
- Pinkel D, Lanlegent J, Collins C, Fuscoe J, Segreaves R, et al. (1986) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9138–42.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) 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* 104: 393–400.
- Cameron JM (2001) What controls the length of noncoding DNA? *Curr Opin Genet Dev* 11: 652–659.
- Tóth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different Eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10: 967–981.

53. Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194–200.
54. Ustinova J, Achmann R, Cremer S, Mayer F (2006) Long Repeats in a Huge Genome: Microsatellite Loci in the Grasshopper *Chorthippus biguttulus*. *J Mol Evol* 62: 158–167.
55. Thoren PA, Paxton RJ, Estoup A (1995) Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). *Insect Mol Biol* 4: 141–148.
56. Butcher RD, Hubbard SF, Whitfield WG (2000) Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Mol Biol* 9: 375–384.
57. Gregory TR (2001) Animal genome size database; <http://www.genomesize.com>.
58. Chang SB, Yang TJ, Datema E, van Vugt J, Vosman B, et al. (2008) FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome Res* 16: 919–33.
59. Cuadrado A, Jouve N (2011) Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 12: 205.
60. Messier W, Li S-H, Stewart C-B (1996) The birth of microsatellites. *Nature* 381: 483.
61. Wilder J, Hollocher H (2001) Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molec Biol Evol* 18: 384–392.
62. Nadir E, Margalith H, Gallily T, Ben-Sasson SA (1996) Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6470–6475.
63. Johnson PCD, Webster LMI, Adam A, Buckland R, Dawson DA, et al. (2006) Abundant variation in microsatellites of the parasitic nematode *Trichostrongylus tenuis* and linkage to a tandem repeat. *Mol Biochem Parasitol* 148: 210–218.
64. Grandi FC, An W (2013) Non-LTR retrotransposons and microsatellites: Partners in genomic variation. *Mob Genet Elements* 3: e25674.
65. Palacios-Gimenez O, Bueno D, Cabral-de-Mello DC (2014) Chromosomal mapping of two *Mariner*-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveals enrichment in euchromatin. *Eur J Entomol*. doi: 10.14411/eje.2014.000
66. Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol* 4: R13.
67. Carmona A, Friero E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado A (2013) The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA. *Ann Bot* 112: 1845–55.
68. Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schroder JH, Zischler H, et al. (1990) Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol* 30: 456–462.
69. Vanzela ALL, Swarça AC, Dias AL, Stolf R, Ruas PM, et al. (2002) Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. *Cytologia* 67: 9–13.

5. Referências

ANLEITNER, J.; HAYMER, D. Y enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Chromosoma**, v. 101(5-6) p. 271-8, mar. 1992.

ARNHEIM, N. Concerted evolution of multigene families. In: **Genes and Evolution of Genes and Proteins**, M. Nei and R.K. Koehn (eds.). Sinauer, Sunderland, pp. 36.61, 1983.

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.

BERIDZE, T. G. Satellite DNA. Springer-Verlag, Heidelberg. 1986.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: An impression 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**, v.443 p.521-524, oct. 2006.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.; CABRAL-DE-MELLO, D. 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(6): e66532, jun. 2013.

BUGROV, A. G., et al. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). **Chromosome Res**, v.15 p.315-325, may. 2007.

BUTCHER, R. D.; HUBBARD, S. F.; WHITFIELD, W. G. Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera:Ichneumonidae). **Insect Mol Biol**, 9: 375–384, aug. 2000.

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, apr. 2010.

CABRERO, J., et al. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, v.112 p.207–211, dec. 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 *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. **Genetica**, v.117 p.77–84, jan. 2003.

CAMACHO, J. P. M.; PARKER, J. First B Chromosome Conference. Miraflores de la Sierra, Madrid. 1993.

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.

CARMONA, A.; FRIERO, E.; DE BUSTOS, A.; JOUVE, N.; CUADRADO, A. The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA. **Ann Bot**, 112: 1845–55, dec. 2013.

CHANG, S. B.; YANG, T. J.; DATEMA, E.; VAN VUGT, J.; VOSMAN, B., et al. FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. **Chromosome Res**, 16: 919–33, aug. 2008.

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

COMERON, J. M. What controls the length of noncoding DNA? **Curr Opin Genet Dev**, 11: 652–659, dec. 2001.

CUADRADO, A.; CARDOSO, M.; JOUVE, N. Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. **Cytogenet Genome Res**, 120: 210–219, may. 2008.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). **Chromosoma**, 119: 495–503, apr. 2010.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. **BMC Genomics**, 12: 205, apr. 2011.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Similarities in the chromosomal distribution of AG and AC repeats within and between *Drosophila*, human and barley chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, 119: 91–99, dec. 2007.

- DIMITRI, P.; JUKANOVIC, N.; ARCA, B. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. **Mol Biol Evol**, v.20 p.503–512, apr. 2003.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet**, v.5(6) p.435-45, jun. 2004.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Ann Rev Genet**, v.41 p.331-368, dec. 2007.
- GRANDI, F. C.; AN, W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites: Partners in genomic variation. **Mob Genet Elements** 3: e25674, jul. 2013.
- GRAPHODATSKY, A. S., et al. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. **Chromosome Res**, v.13 p.113-122, 2005.
- GREGORY, T. R. Animal genome size database; <http://www.genomesize.com>. 2001.
- GUTKNECHT, J.; SPERLICH, D.; BACHMANN, L. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subobscura* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**, v.103 p.539-544, feb. 1995.
- HARDING, R. M.; BOYCE, A. J.; CLEGG, J. B. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. **Genetics**, v.132 p.847-859, aug. 1992.
- HOUBEN, A.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; KLEMMER, 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, mar. 1994.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Individual-specific fingerprints of human DNA. **Nature**, v.316 p.76-79, jul. 1985.
- 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 p. 1- 114, 1979.
- JOHNSON, P. C. D.; WEBSTER, L. M. I.; ADAM, A.; BUCKLAND, R.; DAWSON, D. A., et al. Abundant variation in microsatellites of the parasitic nematode *Trichostrongylus tenuis* and linkage to a tandem repeat. **Mol Biochem Parasitol** 148: 210–218, aug. 2006.
- JONES, R. N. B chromosomes in plants. Tansley review no. 85 **New Phytol**, v.131 p.411-434, apr. 1995.
- JONES, R. N.; REES, H. B chromosome. **New York: Academic Press**, 1982.

- KEJNOVSKY, E.; MICHALOVOVA, M.; STEFLOVA, P.; KEJNOVSKA, I.; MANZANO, S., et al. Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. **PLoS ONE** 8: e45519, jan. 2013.
- 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**, v.102 p.553-562, sep. 1993.
- KUBAT, Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome**, 51: 350–356, may. 2008.
- LANDER, E. S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409 p.860–921, feb. 2001.
- LI, Y. C., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, dec. 2002.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dyn**, V.7 p.1-28, jun. 2012.
- 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*. **Cytogenet Genome Res**, v.121 p.260-265, aug. 2008.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., et al. Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v.71 p.352– 362, jan. 1993.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., et al. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Res**, v.2 p.87–92, oct. 1994.
- LORETO, V., et al. Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. **Chromosome Res**, v.16 p.233-241, dec. 2008.
- 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**, p.421-453, 2007.

- MATSUBARA, K.; KNOPP, T.; SARRE, S. D.; GEORGES, A.; EZAZ, T. Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). **Mol Cytogenet**, 6: 60, dec. 2013.
- MESSIER, W.; LI, S-H.; STEWART, C-B. The birth of microsatellites. **Nature**, v.381 p.483, jun. 1996.
- MONTIEL, E. E. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J. Evolución de elementos móviles en ortópteros. **Editorial de la Universidad de Granada**, p.230, mar. 2012.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat Genet**, 30: 194–200, feb. 2002.
- NADIR, E.; MARGALITH, H.; GALLILY, T.; BEN-SASSON, S. A. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 6470–6475, jun. 1996.
- NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M.; SCHRODER, J. H.; ZISCHLER, H., et al. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J Mol Evol**, 30: 456–462, mar. 1992.
- NEI, M.; GU, X.; SITNIKOVA, T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA** v.94 p.7799–806, jul. 1997.
- NEI, M.; ROGOZIN, I. B.; PIONTKIVSKA, H. Purifying selection and birth-anddeath evolution in the ubiquitin gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.97 p.10866–71, sep. 2000.
- NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Ann Rev Genetics**, v.39 p.121-152, dec. 2005.
- NIIMURA, Y.; NEI, M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA** v.100 p.12235–40, aug. 2003.
- NUR, U., et al. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**, v.240 p.512-514, apr. 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.
- ÖSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot Notiser**, v.2 p.157-163, 1945.

- PALACIOS-GIMENEZ, O.; BUENO, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of two Mariner-like elements in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveals enrichment in euchromatin. **Eur J Entomol**, doi: 10.14411/eje.2014.000, jul. 2014.
- PALESTIS, B. G., et al. Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. **Genetica**, v.138 p.1181-1189, dec. 2010.
- PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v.100 p.564–573, apr. 2008.
- PINKEL, D., et al. 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, dec. 1988.
- POKORNÁ, M.; KRATOCHVIL, L.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics**, 12: 90, out. 2011.
- 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.
- REBUZZINI, P., et al. Quantitative variation of LINE-1 sequences in five species and three subspecies of the subgenus *Mus* and in five Robertsonian races of *Mus musculus domesticus*. **Chromosome Res**, v.17 p.65-76, jan. 2009.
- SANTOS, J.; LLUIS SERRA, L.; SOLÉ, E.; PASCUAL, M. FISH mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species. **Chromosome Res**, 18: 213–226, mar. 2010.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v.109 p.365-371, sep. 2000.
- SHAPIRO, J. A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biol Rev**, v.80 p.1-24, may. 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.
- SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R. K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. **Genome Biol**, 4: R13, jan. 2003.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res**, v.75 p.304–306, nov. 1972.

- TACHIDA, H.; IIZUKA, M. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics**, v.131 p.471-478, jun. 1992.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12 p.4127-4138, may. 1984.
- TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; VICARI, M. R.; FARIAS, I. P., et al. Evolutionary dynamics of repetitive DNA in *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae): A fish model for sex chromosome differentiation. **Sex Dev**, 7: 325–333, nov. 2013.
- 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 B-chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v.132 p.94-9, aug. 2011.
- TERUEL, M., et al. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v.125 p.286-291, oct. 2009.
- THOREN, P. A.; PAXTON, R. J.; ESTOUP, A. Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L) (Hymenoptera:Vespidae). **Insect Mol Biol**, 4: 141–148, aug. 1995.
- TÓTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different Eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res**, 10: 967–981, jul. 2000.
- UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **EMBO J**, v.21 p.5955-5959, nov. 2002.
- USTINOVA, J.; ACHMANN, R.; CREMER, S.; MAYER, F. Long Repeats in a Huge Genome: Microsatellite Loci in the Grasshopper *Chorthippus biguttulus*. **J Mol Evol**, 62: 158–167, feb. 2006.
- VANZELA, A. L. L.; SWARCA, A. C.; DIAS, A. L.; STOLF, R.; RUAS, P. M., et al. Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia** 67: 9–13. 2002.
- VIEIRA, C., et al. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Mol Biol Evol**, v.16 p.1251–1255, sep. 1999.
- VITTE, C.; BENNETZEN, J. L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. **Proc Natl Acad Sci, USA** v.103 p.17638–17643, sep. 2006.
- WANG, X., et al. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. **Nature communications**, 5: 2957, jan. 2014.

- WEBB, G. C., et al. Cytogenetics of the parthogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. **Chromosoma**, v.67 p.309-339, 1978.
- WESSLER, S.; BUREAU, T.; WHITE, S. E. LTR-retrotransposons and MITE: important players in the evolution of plant genomes. **Curr Opin Gent Dev**, v.5 p.814–821, dec. 1995.
- WHINNETT, A.; MUNDY, N. I. Isolation of novel olfactory receptor genes in marmosets (*Callithrix*): insights into pseudogene formation and evidence for functional degeneracy in non-human primates. **Gene**, v.304 p.87–96, jan. 2003.
- WICKER, T., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Rev Genet**, v.8 p.973-982, dec. 2007.
- WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molec Biol Evol**, 18: 384–392, mar. 2001.
- WILSON, E. B. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science**, v.26 p.870-871, 1907.

ANEXO

Aluno

Orientador

20/03/2015