

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**GABRIELLA CAMPOS ROCHA**

**Análise cariotípica de duas espécies de  
cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera,  
Cercopidae)**



Rio Claro  
2015

**GABRIELLA CAMPOS ROCHA**

**Análise cariotípica de duas espécies de  
cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera,  
Cercopidae)**

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

Co-orientador: Allison Anjos

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

Rio Claro

2015

595.7  
R672a Rocha, Gabriella Campos  
Análise cariotípica de duas espécies de cigarrinhas do gênero Mahanarva (Hemiptera, Cercopidae) / Gabriella Campos Rocha. - Rio Claro, 2015  
15 f. : il., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Diogo C. Cabral-de-Mello  
Coorientador: Allison Anjos

1. Inseto. 2. DNAs repetitivos. 3. Auchenorrhyncha. 4. Marcadores cromossômicos. 5. Famílias multigênicas. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai, Luiz, que me apoiou e que desde criança me ensinou a respeitar a natureza e amar os animais e me influenciou na escolha do curso. À minha mãe, Rosângela minha maior heroína e fonte de inspiração, por sempre confiar e me incentivar em tudo que faço. Ao meu irmão, Luiz pela paciência, pela amizade e por me apoiar sempre.

À minha família de quatro patas, que me dá alegrias, me inspira e ameniza o peso dos dias difíceis.

Ao meu namorado Augusto que sempre teve uma palavra de apoio e amor para me acalmar e por toda a paciência e companheirismo que foram fundamentais para mim nesses últimos dois anos.

Aos meus amigos, Karla, Jaime, Jeremias, Tatiane, Luiz e Vanderlei que mesmo longe estiveram presentes.

À minha querida ex-companheira de quarto e amiga, Jamille que me ensinou a nunca desistir.

Às minhas amigas de república, que se tornaram amigas para a vida toda. À Juliana por todas as risadas, aprendizados e amor. À Mareike, que me contagiou com sua alegria, disposição e carinho.

À minha querida amiga Nahanna que sempre esteve presente e me ajudou quando precisei.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas 2011 e aos demais alunos do curso que contribuíram para a meu crescimento pessoal e profissional.

A todos do GECEA, Nahanna, Dioguinho, Allison, Otávio, Ana Beatriz, Vanessa, Flávia, Keteryne, Carolina e Rafael pela ajuda e amizade.

Ao meu orientador Professor Dr. Diogo, por tornar possível esse projeto. Pelos ensinamentos, pela paciência e por ser um excelente profissional, no qual me espelho.

Ao meu co-orientador Allison, por me ensinar com tanta paciência os protocolos do laboratório, auxiliar na correção dos textos, responder todas as dúvidas e apoiar o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, aos professores, funcionários e a agência de fomento à pesquisa CNPq por me conceder a bolsa PIBIC.

E a todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## Resumo

Os membros da família Cercopidae, popularmente conhecidos como cigarrinhas, apresentam cerca de 150 gêneros e 1.500 espécies vivendo em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, as cigarrinhas do gênero *Mahanarva* são pragas de grande incidência em monoculturas, especialmente em cana-de-açúcar e pastagens, representando grandes prejuízos anuais para a agricultura e pecuária. Apesar da grande importância econômica do grupo pouco se sabe a respeito de suas características cromossômicas e moleculares e nenhuma análise com enfoque no entendimento da organização e possível papel de DNAs repetitivos na organização genômica do grupo foi realizada. Levando-se em conta o impacto dos DNAs repetitivos na diversificação cromossômica/genômica do grupo, nesse trabalho estudamos duas espécies do gênero *Mahanarva* (*M. liturata* e *M. quadripunctata*) a partir do uso de marcadores cromossômicos baseados nesta classe de DNAs. Foram realizadas análises clássicas para descrição das características gerais dos cariótipos e o estudo dos DNAs repetitivos se dará através das técnicas de CMA3/DA/DAPI e FISH com sondas de DNAr 18S, genes de pequenos RNAs nucleares U1, histona H3, sequência telomérica e fração *Cot*-1. Os dados foram analisados de maneira comparativa buscando entender os processos envolvidos na diversificação dos cariótipos de ambas espécies.

## Sumário

Resumo .....	3
1. Introdução .....	5
1.1 Considerações gerais sobre a família Cercopidae .....	5
1.2 Estudos cromossômicos da família Cercopidae e do gênero <i>Mahanarva</i> ....	6
1.3 Classificação, estrutura e organização genômica dos DNAs repetitivos nos genomas eucarióticos .....	7
2. Objetivo .....	9
2.1 Objetivo específicos .....	9
3. Materiais e Métodos .....	10
3.1 Coleta, armazenamento e preparação cromossômica .....	10
3.2 Extração de DNA e isolamento de DNAs repetitivos por PCR .....	10
3.3 Fração <i>Cot-1</i> .....	11
3.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente .....	11
4. Resultados .....	12
5. Discussão .....	15
6. Conclusão .....	19
7. Bibliografia .....	20

## 1. Introdução

### 1.1 Considerações gerais sobre a família Cercopidae

A família Cercopidae (Ordem Hemiptera; subfamília Auchenorrhyncha) compreende os animais popularmente conhecidos como cigarrinhas, que são insetos sugadores que se alimentam do xilema de diversas plantas vasculares (PALADINI et al, 2008). Estima-se que existam cerca de 150 gêneros e 1.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (LIANGE e WEBB, 2002). No Brasil, algumas dessas espécies são conhecidas por sua importância econômica, causando danos a cultivos de café, ameixa, citros, plantações de cana-de-açúcar e pastagens (AZEVEDO-FILHO, 2007; PALADINI, 2008). As fêmeas desses animais colocam os ovos na base da planta hospedeira, ao nível do solo, e quando eclodem as ninfas podem viver tanto na base quanto dentro das raízes superficiais das plantas, de onde se alimentam de seiva bruta. Durante a alimentação, as ninfas injetam uma substância espumosa no sistema vascular da planta, que tem por função proteger o animal contra a dessecação e inimigos naturais. Isto causa a deterioração dos vasos traqueais da planta e acaba dificultando o fluxo de água e nutrientes (VALÉRIO, 2009; LEAL, 2008). Os adultos também se alimentam do xilema, mas causam maiores danos que as ninfas, pois injetam também compostos tóxicos na planta, que impedem a atividade fotossintética e resultam em necrose que pode se estender até o ápice das folhas (LOHMAN et al, 2010).

No Brasil, o gênero *Mahanarva* tem grande incidência em monoculturas, como cana-de-açúcar e pastagens (RESENDE et al, 2013; LEAL, 2008). No que se refere a cana-de-açúcar, a eliminação da prática de queima da palha nas colheitas provocou um aumento significativo na população das cigarrinhas, que antes tinham seus ovos destruídos pelo fogo (DINARDO-MIRANDA et al, 2001). O aumento populacional ocorre devido à palha que se acumula durante os cortes das colheitas e mantém o solo úmido, proporcionando um ambiente favorável para a proliferação desses animais (AUD et al, 2010; LEAL, 2008). As

cigarrinhas atacam as raízes superficiais da cana, resultando em folhas desnutridas, desidratadas e com aspecto amarelado, tudo isso diminui a qualidade da cana utilizada como matéria prima para a produção de açúcar e álcool (LEAL, 2008).

Outro exemplo de dano causado pelo grupo ocorre em pastagens de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Na América tropical, a bovinocultura de corte depende das gramíneas forrageiras em seus sistemas de produção extensivos, por elas constituírem a base da alimentação do gado de corte (VALÉRIO, 2009). As cigarrinhas por sua vez, são consideradas um dos maiores problemas atuais da bovinocultura, pois são pragas anuais das gramíneas forrageiras e atacam em altos níveis populacionais, causando sérios danos e diminuindo a capacidade de suporte das forrageiras (VALÉRIO, 2009).

## **1.2 Estudos cromossômicos da família Cercopidae e do gênero *Mahanarva***

Apesar da importância econômica da família Cercopidae, pouco se sabe a respeito das características genéticas, incluindo aspectos cromossômicos, deste grupo. Os dados publicados sugerem uma variabilidade em relação ao número diplóide. Os primeiros estudos citogenéticos sobre a família Cercopidae foram realizados por Boring (1907), que estudou 22 espécies. Em seguida, Halka (1959) observou que o número diplóide das espécies estudadas variou de  $2n=10$  a  $2n=39$ . Além disso, o cariótipo de quatro espécies estudadas por Halka (1954) *Aphrophora forneri*, *Aphrophora alni*, *Neophilaenus lineatus* e *N. exclamationis*, apresentaram cariótipos com  $2n=16/XY$ ,  $15/X0$ ,  $15/X0$  e  $20/XY$ , respectivamente. O estudo realizado por Dey (1991), por sua vez, constatou  $2n=28/XY$  para quatro espécies do gênero *Cosmoscarta* (*C. dimidiata*, *C. septempunctata*, *C. decisa* e *C. fluviceps*) e apenas uma espécie do gênero (*C. elegans*) apresentou o cariótipo com sistema sexual derivado ( $2n=28/neo-XY$ ). Espécies do gênero *Mahanarva* (*M. fimbriolata* e *M. posticata*) foram primeiro estudadas por Marin-Morales (2002), que observou o número

decromossomos e de determinação de sexo de  $2n=18/X0$  para machos e  $2n=18/XX$  para fêmeas nas duas espécies, além da presença de cromossomos holocinéticos, o que está de acordo com o obtido por Halka (1959) e Lello et al (1982) para espécies da subfamília Auchenorrhyncha. Castanhole (2010), por sua vez, observou que *Deois flavopicta* apresenta o cariótipo de  $2n=19/X0$  e *Notozulia enteriana*,  $2n=15/X0$ .

Os cromossomos holocinéticos observados nas cigarrinhas são caracterizados pela ausência de constrição primária (centrômero) e a atividade cinética para migração dos cromossomos para os polos celulares pode acontecer em qualquer região do cromossomo (HALKKA, 1964; DEY, 1991; MARIN-MORALES et al. 2002; CASTANHOLE et al. 2010). Os cromossomos holocinéticos foram descritos para uma variedade de plantas e invertebrados e surgiram independentemente ao longo da evolução dos eucariotos. Em teoria, os cromossomos holocinéticos permitem uma rápida evolução cariotípica, pois fissões em sua estrutura resultam em fragmentos que retêm atividade centromérica, permitindo que segreguem normalmente durante a divisão celular, sem que ocorra perda de fragmentos (MELTERS, 2012).

### **1.3 Classificação, estrutura e organização genômica dos DNAs repetitivos nos genomas eucarióticos**

Os DNAs repetitivos compõem grandes frações do genoma de eucariotos podendo constituir mais de 90% do conteúdo total de DNA no genoma de algumas espécies, como observado em humanos (NOWAK, 1994). Durante muito tempo foram considerados como as “frações não codificantes” e pouca atenção foi dada a eles, mas hoje se sabe que esses DNAs repetitivos podem estar envolvidos em processos de regulação, reparo de DNA, diferenciação de cromossomos sexuais e até mesmo codificação de proteínas (CHARLESWORTH, 1994; NOWAK, 1994; KRAEMER e SCHMIDT, 1993). Esses DNAs podem estar organizados de maneira dispersa ou repetidos em tandem no genoma, e são classificados como: a) sequências repetitivas

codificadoras, que incluem algumas famílias multigênicas e b) sequências repetitivas não codificadoras, onde estão incluídos os DNAssatélites, microsátélites, minisátélites, transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH, et al. 1994; MARTINS, et al. 2011).

Uma família multigênica é um grupo de genes que descende de um gene ancestral comum e possui sequências de DNA similares em estrutura e função (NEI e ROONEY, 2005). Dentre essas famílias, as mais estudadas são os genes de RNAr (RNAríbossomal), genes codificadores de proteínas histonas e pequenos RNAs nucleares (RNAsn). As sequências de DNA ribossomal (DNAr) na maioria dos eucariotos estão organizadas em dois distintos grupos arranjados em tandem. O arranjo maior (DNAr 45S) é formado pelos genes que codificam os RNAríbossomais 18S, 5.8S e 28S e são separadas por regiões de espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS), enquanto cada cluster de DNAr 45S é separado pelos espaçadores transcritos externos (ETS). O arranjo menor por sua vez, é formado pelas sequências gênicas que transcrevem o RNAr 5S e são espaçadas por regiões espaçadoras não transcritas (NTS) (EICKBUSH e EICKBUSH, 2007; LONG e DAWID, 1980).

As sequências codificadoras de histonas, por sua vez são constituídas de um conjunto de 5 polipeptídeos básicos (H1, H2A, H2B, H3 e H4) presentes em todos os eucariotos. Os genes de histonas estão organizados em sequências moderadamente repetitivas, em clusters únicos com poucos íntrons e espaçados por DNAs não codificantes (KEDES, 1979; NAGODA et al. 2005). Essa organização foi descrita, por exemplo para *Drosophila melanogaster* (LIFTON et al. 1978), mas esses genes também podem estar distribuídos isoladamente, como observado em humanos (ALBIG, et al. 1991) e rato (SITTMAN et al. 1981). Além disso, em *Xenopus laevis* foram observados os dois tipos de organização genômica (RUBERTI et al. 1982).

Outra importante família multigênica é a responsável pela produção dos genes de pequenos RNAs nucleares (RNAsn). Os RNAsn estão envolvidos em um importante processo chamado *splicing* ou recomposição do RNA, no qual ocorre maturação do RNAm através da remoção de íntrons. Esses RNAsn se

associam a proteínas para constituir o spliceossomo. Os genes de RNAsn são codificados por uma família multigênica, que inclui os genes U1, U2, U4, U5 e U6 e formam o spliceossomo principal dos eucariotos (GILBERT, 1978; BUSCH et al. 1982; BRINGMANN and LUHRMANN, 1986; NILSEN, 2003; VALADKHAN, 2005; WEST, 2012). Quanto a organização, os RNAsn U podem apresentar cópias dispersas no genoma, como observado em humanos (MANSER e GESTELAND, 1982) ou organizados *in tandem*, como no sapo *Xenopus laevis* (MATTAJ e ZELLER, 1983), no ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* (YU et al. 1991) e em alguns peixes teleósteos (MARZ et al. 2008).

## **2. Objetivo**

Realizar uma análise comparativa entre duas espécies do gênero *Mahanarva* (*M. liturata* e *M. quadripunctata*) caracterizando a macro-estrutura cromossômica e analisando os padrões de organização de diversos marcadores cromossômicos baseados em DNAs repetitivos, afim de inferir sobre os processos evolutivos ocorrentes nos cariótipos das mesmas.

### **2.1 Objetivo específicos**

**2.1.1.** Caracterizar a macro-estrutura de duas espécies da família Cercopidae, gênero *Mahanarva*, descrevendo o número diploide, sistemas cromossômicos sexuais, possíveis ocorrências de polimorfismos e comportamento dos cromossomos durante a divisão meiótica.

**2.1.2.** Descrever a organização dos blocos de heterocromatina nos cromossomos das duas espécies a partir da técnica de DNA  $C_{0t-1}$  e coloração com fluorocromos base específicos.

**2.1.3.** Analisar os padrões de organização e diversificação dos DNAs repetitivos (famílias multigênicas e sequências teloméricas) do ponto de vista

cromossômico. Os dados foram analisados de maneira comparativa visando o entendimento dos processos envolvidos na diversificação dos cariótipos das duas espécies.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Coleta, armazenamento e preparação cromossômica**

Nesse trabalho foram estudadas duas espécies do gênero *Mahanarva* (família Cercopidae): *Mahanarva liturata* e *Mahanarva quadripunctata*. Os indivíduos foram coletados no Câmpus da UNESP de Rio Claro/SP e no Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade também em Rio Claro. Os folículos testiculares dos indivíduos coletados foram fixados em Carnoy (3:1 100% etanol:ácido acético), enquanto que os indivíduos utilizados posteriormente para a extração de DNA, foram armazenados em tubos contendo etanol 100%. As preparações cromossômicas foram obtidas através da maceração dos testículos com uma gota de ácido acético 50% e a secagem foi feita em chapa aquecida a 40°C. A coloração convencional foi realizada com Giemsa 5%, enquanto que o bandeamento C e a coloração com fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) seguiram os protocolos descritos por Sumner (1972) e Schweizer et al. (1983), respectivamente.

#### **3.2 Extração de DNA e isolamento de DNAs repetitivos por PCR**

A extração de DNA dos tecidos foi realizada a partir do protocolo de Sambrook e Russel (2001). As famílias multigênicas (DNAr 18S, histonas e genes de snRNAs) foram isoladas através de PCR utilizando primers específicos desenhados a partir de sequências depositadas no GeneBank ou previamente publicados. Para o DNAr 18S e gene de histona H3, foram utilizados os primers descritos por Cabral-de-Mello et al (2010) e Teruel et

al(2010) e para o gene de RNAsn U1 foram utilizados os primers descritos por Cabral-de-Mello et al (2012).

### **3.3 Fração *Cot-1***

As amostras enriquecidas em DNAs repetitivos de *M. liturata* e *M. quadripunctata* foram obtidas através da fração *Cot-1* (DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas) seguindo o protocolo de Zwick al. (1997), com modificações. As amostras de DNA contendo 200µL de 100-500ng/µL de DNA genômico em 0,3 M de NaCl foram digeridas com deoxyribonucleases I (Sigma, St Louis, MO, USA) a 0,01U 0,01 U/µL durante 30 a 60sec, variando conforme concentração da amostra.

Em seguida, os fragmentos de DNA foram separados em gel de eletroforese e 1% de agarose. Para cada espécie, 50 µL de DNA fragmentado foram desnaturados a 95°C por 10 minutos, em seguida, colocadas em gelo por 10 segundos e transferidas a banho maria a 65°C para reanelamento por 25 min. Após isso, as amostras foram incubadas a 37°C por 8 minutos com 1U nuclease S1 para digerir o DNA de cadeia única. Os fragmentos passaram por um processo de purificação e foram extraídos utilizando o protocolo tradicional de Fenol (Sambrook e Russel 2001).

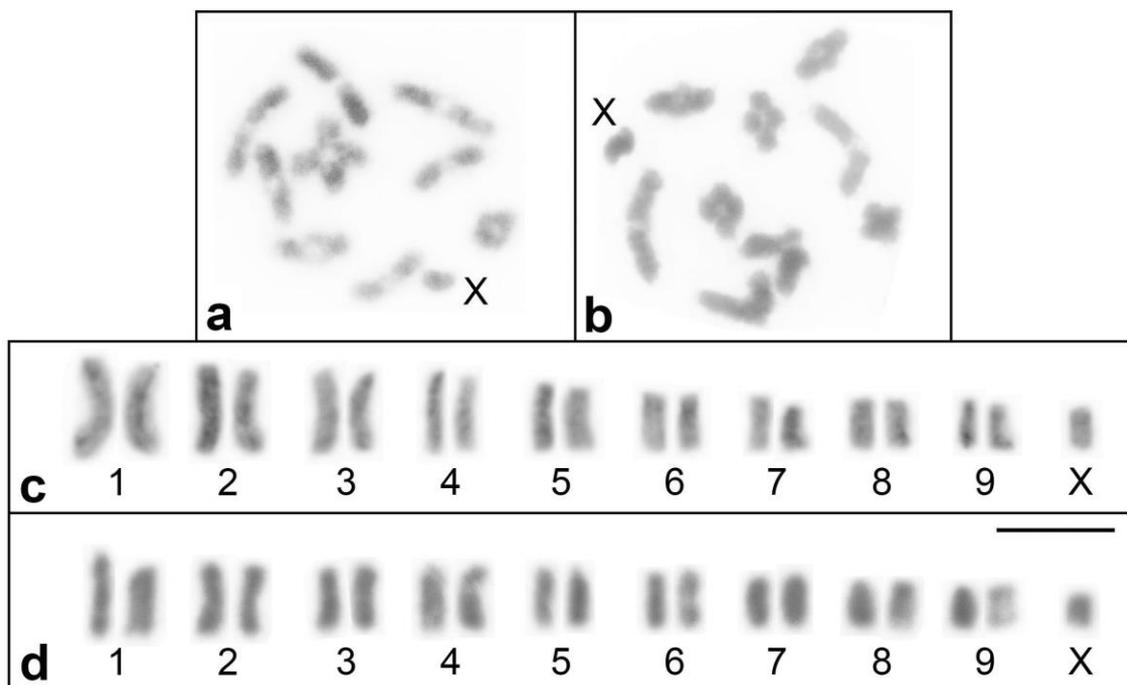
### **3.4 Hibridização *in situ* fluorescente**

As sequências de DNAs repetitivos obtidas por PCR foram marcadas com Digoxigenina 11-dUTP, enquanto Biotina 11-dATP foi usada para marcar sondas através da Nick translation. A hibridização *in situ* fluorescente seguiu o protocolo de Pinkel et al. (1986), com modificações propostas por Cabral-de-Mello et al. (2010) e as sondas foram detectadas usando-se anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) ou streptoavidina-alexa fluor-488 conjugated (Life Technologies). As preparações foram coradas com DAPI e montadas com meio

de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Os sinais da FISH foram observados utilizando-se um microscópio Olympus BX61 equipado com uma lâmpada fluorescente e filtros apropriados. As imagens foram feitas a partir de uma câmera digital DP70 em escala cinza. Por fim, as imagens obtidas foram pseudocoliridas em azul, no caso dos cromossomos e vermelho ou verde para os sinais. Elas foram sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste através do Adobe Photoshop CS2.

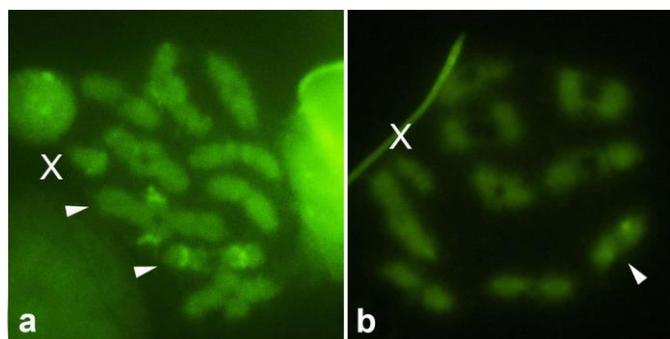
#### **4. Resultados**

As duas espécies estudadas apresentaram o mesmo número diploide e sistema de cromossomos sexuais, compondo o cariótipo  $2n=19,X0$  (machos). Os cromossomos apresentaram tamanho relativamente similares entre si, o que dificultou o reconhecimento de cromossomos específicos (Figura 1). Em meiose foi possível observar 9 pares cromossômicos correspondentes aos autossomos e um cromossomo univalente, o cromossomo X (Figura 1a,b). A similaridade de tamanho entre os cromossomos pode ser observada em células mitóticas (Figura 1c,d). Os cromossomos X para ambas as espécies é de tamanho pequeno, correspondendo ao menor cromossomo do complemento, sendo, portanto, de fácil identificação em meiose. Outra característica observada nas espécies foi a ocorrência de cromossomos holocêntricos, sem centrômero localizado.



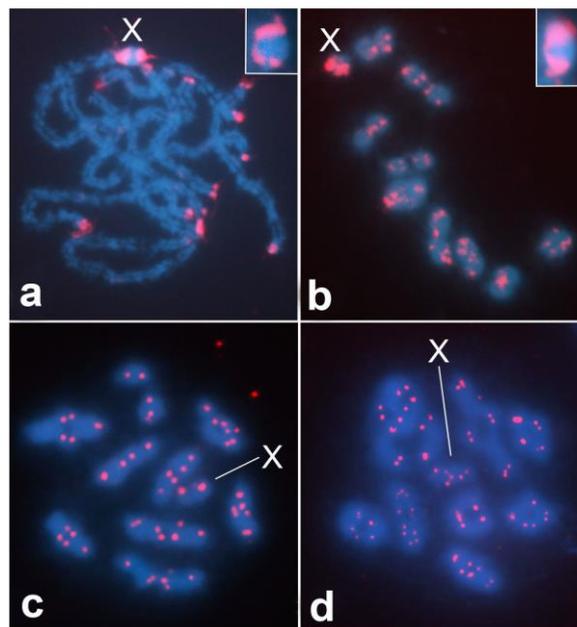
**Figura 1.** Coloração convencional com Giemsa 5% de cromossomos em metáfase I (a,b) e cariogramas (c,d) de *M. liturata* (a,c) e *M. quadripunctata* (b,d). Em (a,b) o cromossomo X está indicado. Barra = 5  $\mu$ m.

A coloração com fluorocromos base específicos CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI revelou regiões ricas em G+C (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) em dois cromossomos de *M. liturata* e apenas um de *M. quadripunctata* (Figura 2a,b) e ausência de regiões ricas em A+T nas duas espécies, com coloração homogênea para o fluorocromo DAPI (resultado não mostrado).



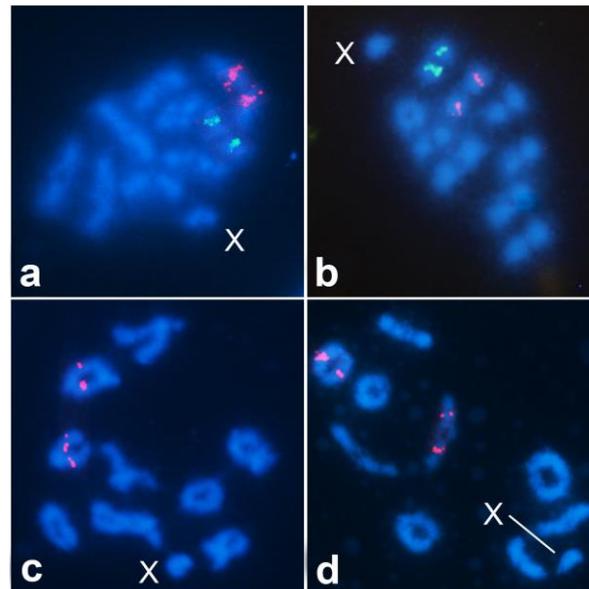
**Figura 2.** Coloração com CMA<sub>3</sub> em metáfases I de (a) *M. liturata* e (b) *M. quadripunctata*. O cromossomo X está indicado e as cabeças de seta indicam os cromossomos com sinais.

Os sinais de FISH correspondentes a fração  $C_{0t-1}$  por sua vez, foram muito evidentes nas regiões terminais dos cromossomos de ambas as espécies (Figura 3a,b). De forma semelhante, a FISH para a sonda da repetição  $(TTAGG)_n$  demonstrou a presença de sinais de hibridização nas regiões terminais de todos os cromossomos das duas espécies (Figura 3c,d), sendo estes de menor tamanho que os sinais de  $C_{0t-1}$ .



**Figura 3.** FISH com sonda de  $C_{0t-1}$  (a,b) e repetição telomérica  $(TTAGG)_n$  (c,d) em *M. liturata* (a,c) e *M. quadripunctata* (b,d). Os cromossomos X estão indicados. Em (a,b) o quadrado em destaque mostra os sinais no cromossomo X.

Já para famílias multigênicas, as duas espécies apresentaram apenas dois sinais (um bivalente) para cada um dos genes de RNAr 18S e histona H3. Estes dois genes encontram-se localizados em cromossomos distintos e na região intersticial em ambos os casos (Figura 4a,b). O gene de RNAsn U1 foi identificado na região intersticial de dois pares cromossômicos tanto em *M. liturata* quanto em *M. quadripunctata* (Figura 4c,d). Pela similaridade de tamanho entre os cromossomos não foi possível inferir se estes cromossomos são os mesmos portadores de sítios de DNAr ou do gene de histona H3.



**Figura 4.** FISH com sonda de DNAr 18S (verde) e histona H3 (vermelho em (a,b) e FISH com sonda de DNAsn U1 em (c,d). (a,c) *M. liturata* (b,d) *M. quadripunctata*. O cromossomo X está indicado.

## 5. Discussão

O cariótipo observado para *M. liturata* e *M. quadripunctata* é  $2n=19/X0$  (machos) e se assemelha a machos de outras duas espécies do gênero *Mahanarva* anteriormente estudadas, *M. fimbriolata* e *M. posticata*, como descrito por Marin-Morales (2002). O número diploide  $2n=19$  também foi observado em outras espécies de Cercopidae, entretanto não é possível inferir se este é o número basal para o grupo, devido amplas variações observadas em outras espécies. Devido a similaridade de tamanho entre os cromossomos, a precisa identificação dos mesmos foi dificultada. Certamente o uso de marcadores, obtidos por exemplo por FISH irão auxiliar no entendimento dos cromossomos que são compartilhados entre as distintas espécies. A presença de cromossomos X univalentes e de menor tamanho em comparação ao restante do complemento também foi observada por Marin-Morales (2002) e Castanhole (2010) para outras espécies da família Cercopidae. A presença de cromossomos holocinéticos é uma característica das duas espécies, a qual é compartilhada com outros membros da Subordem Homoptera (HALKKA, 1959),

incluindo afídeos (BLACKMAN, 1987), espécies de triatomídeos (UESHIMA, 1979; PANZERA et al. 1996) e outras espécies de cigarrinhas como observado em *M. fimbriolata*, *M. posticata* por Marin-Morales (2002) e em *Deois flavopicta* e *Notozulia enteriana* por Castanhole (2010).

Em *M. liturata* dois bivalentes apresentaram CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e *M. quadripunctata* apresentou apenas um bivalente com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, evidenciando que as regiões da heterocromatina ricas em pares de bases G+C nas duas espécies diferem. Kuznetsova (2009) por sua vez, encontrou diferenças interespecíficas na constituição da heterocromatina de duas espécies de cigarrinhas da família Issidae, sendo observado na espécie *Hysteropterum albacetium* apresentou sinais de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e DAPI em seus bivalentes, enquanto que *Algamatum bilobum* mostrou blocos negativos para CMA<sub>3</sub> e positivos para DAPI. Um estudo de 25 espécies da subordem Heteroptera observou-se que há uma diferença interespecífica quanto a acumulação da heterocromatina, variando de cromossomos com muita heterocromatina a outros com poucas ou nenhuma banda, além disso também demonstrou grandes diferenças de tamanho, número e localização dos sinais de CMA<sub>3</sub>/DAPI (BARDELLA, 2013). Variações na distribuição da heterocromatina também foram observadas em representantes das ordens Psocoptera e Odonata, os quais também possuem cromossomos holocinéticos (GOLUB et al. 2004; DE GENNARO et al. 2008). Nosso estudo corrobora a hipótese de que a equilocalidade da heterocromática, ou seja, a tendência de a heterocromatina estar localizada em posições semelhantes ao longo dos cromossomos não homólogos (HEITZ, 1993) não é válida para cromossomos holocinéticos (MANDRIOLI et al. 2003).

O uso da fração *C<sub>ot</sub>-1* nos dá importantes informações sobre a distribuição de DNAs repetitivos no genoma. A sonda indicou sinais de DNA moderada e altamente repetitivos nas regiões terminais dos autossomos, mostrando-se similar para ambas as espécies estudadas. Esse resultado pode indicar que essas sequências repetitivas constituem sequências teloméricas ou estão associadas a regiões subterminais dos cromossomos. Cabral-de-Mello (2010) observou padrões de hibridização da fração *C<sub>ot</sub>-1* em regiões coincidentes a heterocromatina em *Dichotomius geminatus* (Coleoptera),

incluindo blocos terminais em dois pares de cromossomos. Além disso, outras cinco espécies do gênero *Dichotomius* apresentaram sinais de hibridização da fração  $C_{ot-1}$  em regiões terminais e subterminais de seus autossomos (CABRAL-DE-MELLO, 2011). A técnica de fração  $C_{ot-1}$  em gafanhotos da espécie *Abracris flavolineata* revelou enriquecimento de DNAs repetitivos nas frações terminais e intersticiais dos autossomos (BUENO et al. 2013).

Os experimentos de FISH para a sonda  $(TTAGG)_n$  demonstraram sinais de hibridização nos terminais de todos os autossomos estudados para *M. liturata* e *M. quadripunctata*. A sequência  $(TTAGG)_n$  descrita por Okazaki (1993) é conservada em três grandes ordens de insetos, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera (MEYNE et al. 1995; SAHARA et al. 1999; KOJIMA et al. 2002; LORITE et al. 2002; MANDRIOLI, 2002). Essa sequência também foi encontrada para afídeos (Hemiptera: Sternorrhyncha) (SPENCE et al. 1998; BIZARRO et al. 2000) e coleópteros (Coleoptera) e demonstraram certa heterogeneidade na presença da repetição  $TTAGG$  (SAHARA et al. 1999; FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002). Já a ordem Diptera por exemplo, parece ter perdido essa sequência em todos os seus representantes (SAHARA et al. 1999). Existem poucos estudos sobre as sequências teloméricas na ordem Hemiptera, apenas 15 espécies foram estudadas dentro do grupo. Frydrychová et al. (2004) encontrou primeiramente sequências teloméricas  $(TTAGG)_n$  na cigarrinha da espécie *Calligypona pellucida* (Delphacidae). Posteriormente, outros estudos similares foram realizados para cigarrinhas do gênero *Philaenus* (Aphrophoridae) (MARYANSKA-NADACHOWSKA et al. 2013), gênero *Mapucheia chilensis* (Myerslopiidae) (GOLUB et al. 2014) e o gênero *Alebra* (Cicadellidae) (KUZNETSOVA, 2015) todas apresentando a sequência telomérica  $(TTAGG)_n$ . Neste estudo expandimos o registro de ocorrência da sequência de telômero basal de insetos em Auchenorrhyncha, sendo registrado pela primeira vez em Cercopidae.

As famílias multigênicas (18S, U1 e H3) em *M. liturata* e *M. quadripunctata* revelaram diversificação dos padrões de distribuição destas sequências estudadas no do genoma das duas espécies, embora do ponto de vista interespecífico para cada sequência o padrão mostrou-se conservado.

Este dado indica conservação da distribuição de genes de famílias multigênicas, ao menos as estudadas aqui, entre as espécies, sugerindo a ocorrência de cromossomos homeólogos entre as mesmas. Este padrão tem se mostrado conservado também em outras espécies do gênero *Mahanarva* e em outros representantes de Cercopidae (Anjos et al., em preparação). O DNA ribossomal tem sido utilizado em diversas análises moleculares e cromossômicos em insetos, no entanto, poucos estudos foram realizados para o grupo Hemiptera, especialmente para Auchenorrhyncha. Kuznetsova (2015), observou que cinco espécies de cigarrinhas do gênero *Alebra* (Cicadellidae) apresentaram sinais de hibridização de DNAr 18S em regiões subterminais de um par de autossomos de tamanho médio, provavelmente, o par cinco. Já os cromossomos de espécies do gênero *Philaenus* (Aphrophoridae) apresentaram diferenças entre si, tanto no número como na distribuição de DNAr 18S, algumas espécies apresentaram apenas um cluster de genes DNAr 18S em seus autossomos, enquanto que outras apresentaram clusters tanto em autossomos como em cromossomos sexuais (MARYANSKA-NADACHOWSKA et al. 2013). Estudos de DNAr em 92 espécies de Heteroptera, demonstraram que 86 espécies possuem DNAr na porção terminal dos cromossomos (Revisado em Grozeva et al., 2014). Heckmann et al (2011) sugeriu que cromossomos holocinéticos possuem localização terminal do DNAr 18S porque isso garante sua estabilidade. No entanto, embora possam haver pressões seletivas para a localização de DNAr 18S nas regiões terminais de cromossomos holocinéticos (ROA e GUERRA, 2012), alguns estudos em Auchenorrhyncha (KUZNETSOVA et al. 2009; MARYANSKA-NADACHOWSKA et al. 2013), Aphididae (Hemiptera) (FENTON, 1994) Heteroptera (Hemiptera) (GROZEVA et al. 2014) e Lepidoptera (NYGUYEN et al. 2010) sugerem que não existe regiões estritamente específicas para o gene de DNAr 18S em cromossomos holocêntricos, assim como observado para as duas espécies de *Mahanarva* com DNAr 18S intersticial.

Em *Mahanarva* o número de clusters de histona H3 e sua localização é bastante conservado entre as espécies. Em invertebrados, o mapeamento de sequências histona H3 foi realizado principalmente em espécies de moluscos,

crustáceos, anelídeos, equinodermos (CABRERO et al. 2009; CABRAL-DE-MELLO et al, 2011; CABRAL-DE-MELLO, 2011; CABRAL-DE-MELLO et al, 2011; VITURRI et al, 2002; GORNUNG et al, 2005; ZHANG et al, 2007; PÉREZ-GARCÍA et al, 2010; TERUEL et al, 2010) e insetos, principalmente para gafanhotos (CABRERO et al. 2009; CABRAL-DE-MELLO et al, 2011; CABRAL-DE-MELLO et al, 2011). Em gafanhotos, os genes histona H3 apresentam um único cluster em todas as espécies e ocorrem intersticialmente no oitavo ou terceiro cromossomo, demonstrando grande conservação no número de clusters e na localização nos cromossomos do complemento (CABRERO et al. 2009). Outras espécies de moluscos (ZHANG et al. 2007; PÉREZ-GARCÍA et al. 2010) e peixes (PENDÁS et al, 1994; HASHIMOTO et al. 2011) também demonstraram conservação do número de clusters do gene histona H3, com apenas um ou dois cromossomos contendo sinais, no entanto, alguma variabilidade nesses grupos também foi observada. Em gafanhotos, as espécies *Abracris flavolineata* (BUENO, et al. 2013) e *Rhammatocerus brasiliensis* (OLIVEIRA et al. 2011) apresentaram marcações do gene histona H3 dispersas no genoma, o que diverge do padrão conservado que ocorre em outras espécies de gafanhotos como observado por Cabrero et al. (2009).

Assim como para os outros genes, o gene de RNAsn U1 também se mostrou conservado entre as espécies. Embora existam poucos estudos sobre os genes que codificam pequenos RNAsn, alguns estudos citogenéticos sobre o gene U1 existentes indicaram também alta conservação em peixes ciclídeos, nos quais os genes se mostraram presentes em um único par cromossômico, contrastando com crustáceos, cujo os genes se comportaram de forma mais dinâmica no genoma (CABRAL-DE-MELLO, et al. 2012; PELLICIA, et al. 2011; BARZOTTI et al. 2003).

## **6. Conclusão**

Os dados obtidos neste trabalho indicam ampla conservação da macroestrutura cromossômica, incluindo número diploide e sistema de cromossomos sexuais. Além disso, nota-se conservação da heterocromatina (DNAs

repetitivos) e da organização de famílias multigênicas nos cromossomos das duas espécies. Embora tenha havido diferença entre a riqueza de pares de base da heterocromatina. A marcação com sonda telomérica expande o conhecimento relativo a ocorrência da repetição TTAGG em *Auchenorrhyncha*, sendo relatada pela primeira vez em *Cercopidae*. Embora as espécies aqui estudadas possuam cromossomos holocêntricos, que podem sofrer quebras ou fusões sem prejuízo para sua perfeita segregação, isto não foi observado, sugerindo estabilidade cromossômica para o grupo.

## 7. Bibliografia

AUAD, A.M et al, **Genetic variability of *Maharva* sp (Hemiptera:Cercopidae) collected from different sites in Brasil.** Genetics and Molecular Research, v. 9, n. 2, 1005-1010, 2010

AMARGER, V. et al. **Analysis of distribution in the human, pig, and rat genomes points toward a general subtelomeric origin of minisatellite structures.** Genomics, v. 52, n. 1, p. 62–71, 15 ago. 1998

AZEVEDO-FILHO, S. W et al. **Espécies de Cercopídeos (Hemiptera: Cercopidae) associados à cultura da videira no Brasil.** Biociências BIOCÊNCIAS, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 180-206, jul. 2007

ALBIG, W. et al. **Isolation and characterization of two human H1 histone genes within clusters of core histone genes.** Genomics, v. 10, n. 4, p. 940–8, ago. 1991.

BARDELLA, VB; FERNANDES, T; VANZELA, A.L.L. **The conservation of number and location of 18S sites indicates the relative stability of rDNA in species of *Pentatomomorpha* (Heteroptera).** Genome, v. 56, p. 425-429, 2013.

BARZOTTI, R; PELLICCIA, F; ROCCHI, A. **Identification and characterization of U1 small nuclear RNA genes from two crustacean isopod species.** Chromosome Res. v. 11, p. 365–373, 2003.

BIZZARO, D; MANDRIOLI, M; ZANOTTI, M; GIUSTI, M; MANICARDI, G.C. **Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera).** Genetica, v. 108, p. 197–202, 2000.

BLACKMAN, R.L. **Reproduction, cytogenetics and development, in Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control** edited by A.K. Minsk and P. Harrewijn. Elsevier, Amsterdam, vol. A, p. 163–195, 1987.

BORING, A. M. **A study of the spermatogenesis of 22 species of the *Membracidae, Jassidae, Cercopidae* and *Fulgoridae* with special reference to the behavior of the odd chromosome.** Journal of Experimental Zoology, v. 4, p. 469–514, 1907.

BRINGMANN, P; LUHRMANN, R. **Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents.** The EMBO Journal. v.5, p.3509-3516, 1986.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. **Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading.** PLoS ONE, v. 8, p. 66532, 2013.

BUSCH, H., REDDY, R., ROTHBLUM, L. & CHOI, Y. C. **SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing.** Annual Review of Biochemistry, v. 51, p.617-654, 1982.

CABRAL-DE-MELLO, DC; CABRERO, J; LÓPEZ-LÉON, MD, Camacho JPM. **Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location.** Genetica., v. 139, p. 921-931, 2011.

CABRAL-DE-MELLO, D.C, MARTINS, C.; SOUZA, MJ; MOURA, RC. **Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families.** Cytogenet Genome Res. v.132, p. 89-93, 2011

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

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. **Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*.** Chromosome Research, v. 20, p. 279-292, 2012

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, MD.; TERUEL, M.; CAMACHO, JPM. **Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers.** Chromosome Res. v. 17, p. 397-404, 2009.

CASTANHOLE, M. M. U. et al. **Meiotic chromosomes and nucleolar behavior in testicular cells of the grassland spittlebugs *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata* and *Notozulia enteriana* (Hemiptera, Auchenorrhyncha).** Genetics and Molecular Biology, v. 33, p. 244–252, 2010.

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

DE GENNARO, D.; REBAGLIATI, P.J.; MOLA, LM. **Fluorescent banding and meiotic behavior in *Erythrodiplax nigricans* (Libellulidae) and *Coryphaeschna perrensi* (Aeschnidae) (Anisoptera, Odonata).** Caryologia Vol. 61, n.1, p. 60–67, 2008.

DEY, S. K. **Chromosomes of Five Species of Spittle Bugs (Homoptera, Cercopidae)**. *Cytologia*, v. 56, n. 4, p. 523–526, 1991.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. **Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae)**. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 1, p. 145-149, 2001.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. **Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes**. *Genetics*, v. 175, n. 2, p. 477–85, fev. 2007.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. **DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes**. *Annual review of genetics*, v. 41, p. 331–68, jan. 2007.

FRYDYCHOVÁ, R; MAREC, F. **Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera)**. *Genetica*. v.115, p. 179–187, 2002

FRYDRYCHOVÁ, R; GROSSMANN, P; TRUBAC, P; VÍTKOVÁ, M; MAREC, F.: **Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects**. *Genome* v. 47, p.163–178, 2004.

GILBERT, W. **Why genes in pieces?** *Nature*, p. 271-501, Feb, 1978.

GOLUB, NV.; NOKKALA, S.; KUZNETSOVA, VG: **Holocentric chromosomes of Psocids (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA 3 and DAPI**. *Folia biologica (Kraków)* V. 52, p. 143–149, 2004.

GORNUNG, E; KARTAVENKO, T; KURCHASHOVA, S; KIREEV, I; FAIS, D. **Physical mapping of the 5S rRNA in the common sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea), by in situ hybridization**. *Cytogenet Genome Res.* v. 111, p. 186C, 2005.

HASHIMOTO, DT; FERGUSON-SMITH, MA; RENS, W; FORESTI, F; PORTO-FORESTI, F. **Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene**

**Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). Cytogenet Genome. Res.**,v. 134, p. 64-71, 2011

HALKKA, O. **Recombination in Six Homopterous Families.** Evolution, v. 18, n. 1, p. 81–88, 1964.

HALKKA, O. **Chromosome studies the Hemíptera, Homóptera, Anchenorrhyncha.** Ann. Acad. Sci. Fernn., Series A. IV. Biológica, v. 43, p. 1-71, 1959.

HEITZ, E. **Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung.** 2 // Zellf. Mik. Anat. V. 20, p. 237-287, 1933.

KAZAZIAN, H. H. **Mobile elements: drivers of genome evolution.** Science (New York, N.Y.), v. 303, n. 5664, p. 1626–1632, 12 mar. 2004.

KEDES, L. H. **Histone genes and histone messengers.** Annual review of biochemistry, v. 48, p. 837–70, jan. 1979.

KIDWELL, M. G. **Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes.**Genetica. v. 115, n. 1, p. 49–63, maio. 2002.

KOJIMA, K.; KUBO, J.; FUJIWARA, H. **Complex and tandem repeat structure of subtelomeric regions in the Taiwan cricket, *Teleogryllus taiwanemma*.** J. Mol. Evol, v. 54, p. 474–485, 2002.

KRAEMER, C.; SCHMIDT, E. R. **The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements.** Chromosoma. v. 102, n. 8, p. 553–62, out. 1993.

KUTZNETSOVA. et al. **Evidence for TTAGG telomere repeats and rRNA gene clusters in leafhoppers of the genus *Alebra* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae).** Eur. J. Entomol. v. 112, p.207-214, 2015.

LEAL, et al. **Influência da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera:Cercopidae) e seus métodos de controle sobre a produtividade e a qualidade da cana de açúcar.** Nucleus, edição especial, p. 55-64, 2008

LELLO, E; M. MENEZES & M.I.P. Coelho. **Chromosomes studies on leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae)**. Rev. Bras. Genet. v. 5, p. 69-93, 1982.

LI, Y.-C.et al. **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review**. Molecular ecology, v. 11, n. 12, p. 2453–65, dez. 2002.

LIANG, A.-P.; WEBB, M. D. **New taxa and revisionary notes in Rhinaulacini spittlebugs from southern Asia (Homoptera: Cercopidae)**. Journal of Natural History, v. 36, n. 6, p. 729–756, abr. 2002.

LIFTON, R. P. et al. **The Organization of the Histone Genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and Evolutionary Implications**. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 42, p. 1047–1051, 1 jan. 1978

LONG, E. O.; DAWID, I. B. **Repeated genes in eukaryotes**. Annual review of biochemistry, v. 49, p. 727–764, 1980.

LOHMANN, T. R.; PIETROWSKI, V.; BRESSAN, D. F. **Flutuação populacional de cigarrinhas-das-pastagens na Região Oeste do Paraná. Population dynamics of spittlebugs in the Western Region of Paraná State**. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, p. 1291–1298, 2010.

LORITE, P.; CARRILLO, J.A.; PALOMEQUE, T. **Conservation of (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric sequences among ants (Hymenoptera, Formicidae)**. J. Hered. v. 93, p. 282–285, 2002.

MANDRIOLI, M. **Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosomes of the lepidopteran *Mamestra brassicae***. Chromosome Res. v. 10, p. 279–286, 2002.

MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G.C.; MAREC, F. **Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera)**. Chromosome Res. v.11, p.51-56, 2003.

MANSER, T.; GESTELAND, R. F. **Human U1 loci: genes for human U1 RNA have dramatically similar genomic environments.** *Cell*, v. 29, n. 1, p. 257–64, maio 1982.

MARIN-MORALES, M. A. et al. **Chromosome analysis of two species of sugar cane pests of the genus *Mahanarva* (Homoptera, Cercopidae).** *Caryologia*, v. 55, n. 4, p. 357–360, 2002

MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; OLIVEIRA, S.G.; PINHAL, D. **Animal genomes under the focus of cytogenetics.** New York, Nova Science Publishers, p. 160, 2011.

MARYANSKA-NADACHOWSKA, A; KUZNETSOVA, V.G; KARAMYSHEVA, T.V. **Chromosomal location of rDNA clusters and TTAGG telomeric repeats in eight species of the spittlebug genus *Philaenus* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aphrophoridae).** *Eur. J. Entomol.* v. 110, p. 411–418, 2013.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. F. **Evolution of Spliceosomal snRNA Genes in Metazoan Animals.** *Journal of Molecular Evolution*, v. 67, n. November, p. 594–607, 2008.

MATTAJ, I. W.; ZELLER, R. ***Xenopus laevis* U2 snRNA genes: tandemly repeated transcription units sharing 5' and 3' flanking homology with other RNA polymerase II transcribed genes.** *The EMBO journal*, v. 2, n. 11, p. 1883–1891, 1983.

MELTERS, D. P. et al. **Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis.** *Chromosome research*. v. 20, n. 5, p. 579–93, jul. 2012.

MEYNE, J.; HIRAI, H.; IMAI, H.T. **FISH analysis of the telomere sequences of bulldog ants (Myrmecia: Formicidae).** *Chromosoma*, v. 104, p. 14–18, 1995.

NAGODA, N.; FUKUDA, A.; MATSUO, Y. **Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila***

**americana : coexistence of quartet and quintet units in a genome.** Insect molecular biology, v. 14, n. 6, p. 713–717, 2005.

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

NILSEN, T. W. **The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?** BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, v. 25, n. 12, p. 1147–9, dez. 2003.

NOWAK, R. **Mining Treasures From ' Junk DNA '.** Science, v. 263, n. 5147, p. 608–610, 1994.

OLIVEIRA, NL et al. **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. v. 4, p. 24, 2011.

OKAZAKI, S et al. **Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)<sub>n</sub>, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects.** Mol. Cell. Biol. v. 3, p. 1424–1432, 1993

PALADINI, A, et al, 2008. **Cladistic Analysis of Kanaima Distant, 1909 (Hemiptera, Cercopidae).** Zootaxa. v. 1704, p. 47–63, 2008.

PANZERA, F; PÉREZ, R; HORNOS, S; PANZERA, Y; CESTAU, R. et al **Chromosome number in the Triatominae (Hemiptera – Reduviidae): a review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 91, p. 515–518, 1996.

PELLICIA, F; BARZOTTI, R; BUCCIARELLI, E; ROCCHI, A. **5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences.** Genome. v. 44, p. 331–335, 2001.

PENDÁS, AM.; MORÁN, P; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. **Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout.** *Chromosoma*. v.103, p.147-152, 1994.

PÉREZ-GARCÍA, C; GUERRA-VARELA, J; MÓRAN, P; PASANTES, JJ. **Chromosomal mapping of rRNA genes, core histone genes and telomeric sequences in *Brachidontes puniceus* and *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia, Mytilidae).** *BMC Genetics*, v. 11, p. 109, 2010.

PINKEL.D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

RESENDE, T.T, et al. **The Damage Capacity of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera:Cercopidae) Adults on *Brachiaria ruziziensis* pasture.** *The Scientific World Journal*, 2013.

ROA, F; GUERRA, M. **Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications.** *BMC Evolutionary Biology*, p. 12-225, 2012.

RUBERTI, I. et al. **Characterization of histone genes isolated from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* genomic libraries.** *Nucleic acids research*, v. 10, n. 23, p. 7543–7559, 1982.

SPENCE, J.M; BLACKMAN, R.L; TESTA, J.M; READY, P.D. **A 169-base pair tandem repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group.** *Chromosome Res.*v. 6, p. 167–175, 1998.

SAHARA, K.; MAREC, F & TRAUT, W. **TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods.** *Chromosome Res.* v. 7, p. 449–460, 1999

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual,** 3rd ed..Cold Spring, 2001

SITTMAN, D. B. et al. **Isolation of two clusters of mouse histone genes.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 78, n. 7, p. 4078–82, jul. 1981.

SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M.; WHITE, M.J.D.; CONTRERAS, N. **Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *War-ramaba virgo* and its bisexual relatives. X. Pattern of fluorescent banding.** Chromosoma, v. 88, p. 227-236, 1983.

SUMNER, A.T. **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** Experimental Cell Research, v. 75, p. 304-30, 1972.

SYBENGA, J. **Chromosoma Focus What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis.** Chromosoma, v. 108, p. 209–219, 1999.

TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. **B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust.** Chromosoma, v. 119, p. 217-225, 2010.

UESHIMA, N. **Hemiptera II: Heteroptera, in John B (ed).** Animal Cytogenetics. V .117. Gebrüder Bornträger, Berlin Stuttgart 1979.

VALADKHAN, S. **snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing.** Current opinion in chemical biology, v. 9, p. 603–608, 2005.

VALÉRIO, J. R. **Cigarrinhas-das-pastagens.** Embrapa Gado de Corte, p. 51, 2009.

VITTURI, R; COLOMBA, M; MANDRIOLI, M; PIRRONE, AM. **rDNA (18S-28S and 5S) colocalization and linkage between ribosomal genes and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in the earthworm *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae) revealed by single- and double-colour FISH.** J Hered. v. 93, p. 279-282, 2002.

WEST, S. **The increasing functional repertoire of U1 snRNA.** Biochemical Society transactions, v. 40, n. 4, p. 846–9, ago. 2012.

YU, J. C. et al. **The U1 snRNA gene repeat from the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*): the 70 kilobase tandem repeat ends directly 3' to a U1 gene.** Nucleic acids research, v. 19, n. 5, p. 1093–8, 11 mar. 1991.

ZHANG, L.; BAO, Z; WANG, S.; HUANG, X; HU, J. **Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops.** Genetica, v. 30, p.193-198, 2006.

ZWICK, M.S.; HANSON, R.E.; MCKINGHT, T.D.; NURUL-IRLAM-FARIDI, M.; STELLY, D.M. **A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants.** Genome, v. 40, n. 1, p. 138-142, 1997