

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Tyago Eufrásio de Souza

**Diversidade cromossômica e molecular de gafanhotos
neotropicais**

**Recife
2016**

Tyago Eufrásio de Souza

**Diversidade cromossômica e molecular de gafanhotos
neotropicais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dr.^a Rita de Cássia de Moura

Coorientadora: Dr.^a Tania Tassinari Rieger

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Souza, Tyago Eufrásio de
Diversidade cromossômica e molecular de gafanhotos neotropicais / Tyago Eufrásio de Souza. – Recife: O Autor, 2016.
151 f.: il.

Orientadores: Rita de Cássia de Moura, Tania Tassinari Rieger
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Gafanhoto 2. Mapeamento cromossômico I. Moura, Rita de Cássia de (orient.) II. Rieger, Tania Tassinari (coorient.) III. Título.

595.72

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-184

Tyago Eufrásio de Souza

**Diversidade cromossômica e molecular de gafanhotos
neotropicais**

Aprovado em 10/03/2016

Banca Examinadora

Dra. Rita de Cássia de Moura

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco

Dr. Martín Alejandro Montes

**Departamento de Biologia - Universidade Federal Rural de
Pernambuco**

Dra. Cláudia Rohde

Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neide Santos

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2016

Agradecimentos

Aos meus pais, Arlene e Genilson, e minha irmã Tyene pela compreensão e cumplicidade dedicadas desde o momento que entrei na faculdade. Foram de grande valia para eu poder chegar aqui.

À minha avó Maria (Zézé) pelo carinho e amor incondicionais dedicados ao longo desta caminhada; que embora tenha sua visão comprometida vê coisas que muitas vezes não vejo. Amo muito a senhora, minha vó!

À minha querida Luíses pelo companheirismo dedicado a mim durante esse tempo.

À minha orientadora Profa. Rita Moura pela dedicação e empenho dedicados à realização deste trabalho junto a mim, durante estes quase três anos.

Aos Professores, Tania Rieger e José Ferreira do Laboratório de Experimentação em *Drosophila* (LED)-UFPE, que são de fundamental importância nesta minha caminhada acadêmica, e a todos que fazem ou fizeram parte deste: Evilis, Thati, Nara, Nicole, Diego, Luciana, Terto, Paula, Augusto, Rafaela, Coral, Júlio, Fernanda Ito, Gabrielle, Leandro, Umberto, Bruno, Ítalo, Elis, Karina, Leonardo, Adiles, Fernanda Uchôa, Morse, Jackeline e Jéssica. Valeu pela convivência e companheirismo.

À minha amiga Darlene Paiva por ter me apoiado neste trabalho e ajudado na organização do LED, além dos diversos momentos de descontração e conversas.

Ao Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos (LBGI)-UPE: Profa. Rita e Dr. Geyner Alves pela competência e empenho dedicados à realização deste trabalho e a Igor e Celso pelas contribuições dadas ao trabalho e amizade;

Adriana, Aline, Karol, Crislaine, Moara, Rogean e Rafaelle, pelos momentos de confraternização e pela amizade construída.

Aos que fazem parte do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH)-UFPE: Profa^s. Neide Santos pelo ótimo convívio de trabalho e Vilma Loreto pelo convívio, apoio na obtenção das amostras e juntamente com Luiz, pela colaboração no trabalho de cromossomo B em *O. virens*; Raysa, Adriana Bispo, Allison, Helen, Luana, Marcos, Merilane, Izaquiel, Andrezza, Cibebe, Cirlene; e outros que deixaram sua contribuição, como Kalyne, Amanda, Diogo, Ituza e Jefferson.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LGM)-UFPE: Prof. Éderson Kido, pela concessão dos termocicladores; Manassés e Roberta, pela amizade construída durante o doutorado.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV)-UFPE: Profa^s. Ana Maria Benko Iseppon e Ana Christina Brasileiro Vidal, por ceder o espaço para as corridas de eletroforese em gel, e Santelmo, Diego, Vanessa e Arthur, pela cooperação dispensada.

Ao Edital Reuni-UFPE No. 01/2012 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG-UFPE) e aos professores que o coordenam, pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas de graduação, que ainda tenho contato; Visnu, Diana, Gleice, Lígia e Érica. Valeu pela convivência, cresci muito com vocês!

“Quando, durante uma pesquisa biológica, tiver alguma dúvida, procure a resposta nas plantas ou nos animais.” Hampton L. Carson

Resumo

Nos últimos anos, alguns estudos de mapeamento cromossômico foram realizados em gafanhotos do grupo Acridomorpha, preferencialmente através do uso de sondas de sequências repetitivas. Este trabalho tem como objetivo contribuir para uma melhor compreensão dos aspectos cromossômicos evolutivos em gafanhotos acridomorfos e da diversidade genética de *Ommexecha virens*. Os genes de cópia única *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi*, *Lys* foram localizados nos cromossomos meióticos de *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* e *Stiphra robusta* e *Lys* em *Schistocerca pallens* através de Hibridização *in situ* permanente (PISH). Sequências repetitivas de *rDNA 45S*, *rDNA 5S* e *Histona H3* foram localizadas em *O. virens* através de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Em *O. virens* também foi analisado o cromossomo B por técnicas convencionais, diferenciais e moleculares, bem como a estrutura genética de oito populações naturais (seis de Pernambuco, uma da Bahia e uma do Ceará) do Nordeste brasileiro com o marcador ISSR (regiões entre sequências de repetições simples). Os genes de cópia única apresentaram um padrão conservado de localização em pares cromossômicos grandes, preferencialmente o L1, exceto para *Hsp70* e *Ubi*, localizados no L2. Sinais secundários foram observados em cromossomos médios. A conservação apresentada deve-se a ausência ou pequena ocorrência de rearranjos nos cromossomos destes cariótipos, o que reduz o risco de eventos deletérios, bem como pela localização coincidente com regiões ricas em heterocromatina constitutiva. A conservação da localização destes genes indicou os cromossomos portadores dos *locus* gênicos ancestrais para os genes mapeados. O estudo do cromossomo B em *O. virens* revelou similaridade de tamanho e marcação CMA₃ positiva com o cromossomo 9, sugerindo a possível origem deste cromossomo. Contudo, a presença de sítios de *rDNA 45S* e *Histona H3* no cromossomo 9 e ausência no B, provavelmente pela deleção dessas sequências neste cromossomo, não permitem descartar a possibilidade do B ter se originado de outro cromossomo. A análise genética populacional em *O. virens* mostrou três *cluster*, os quais exibiram relação com aspectos da biologia da espécie, a paisagem dos ambientes amostrados e com as modificações geológicas ocorridas no Nordeste brasileiro, em particular a formação do complexo da Borborema e a Chapada do Araripe.

Palavras-chave: Gafanhoto; Mapeamento cromossômico; Genes de cópia única; Cromossomo B; Diversidade molecular.

Abstract

In recent years, some chromosomal mapping studies were performed in Acridomorpha group grasshoppers, preferably through the use of repetitive sequence probes. In this work in order to contribute to a better understanding of evolutionary chromosomal aspects of acridomorphs and genetic diversity of *Ommexecha virens*. The single copy genes *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi*, *Lys* were located in meiotic chromosomes of *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* and *Stiphra robusta*, and *Lys* in *Schistocerca pallens* through permanent situ hybridization (PISH). Repetitive sequences of *45S rDNA*, *5S rDNA* and *H3 histone* were located in the *O. virens* via fluorescent *in situ* hybridization (FISH). In *O. virens* was also analyzed the B chromosome by conventional, differential and molecular techniques and genetic structure of eight natural populations (six of Pernambuco, one of Bahia and one of Ceará) of the Northeast of Brazil with ISSR marker (inter simple sequence repeat). Single copy genes showed a conserved pattern of location in large chromosomal pairs, preferably L1, except for *Hsp70* and *Ubi*, located in L2. Secondary signals were observed on medium chromosomes. The presented conservation due to absence or occurrence of small rearrangements in these karyotypes, which reduces the risk of deleterious events as well as for matching location with regions rich in heterochromatin. The conservation of the location of these genes indicated the chromosomes carrying the genic *locus* ancestors to the mapped genes. The study of B chromosome of *O. virens* revealed similarity in size and CMA3 positive marking to chromosome 9, suggesting the possible origin of this chromosome. However, the presence of *45S rDNA* sites and *H3 histone* on chromosome 9 and the absence on B, probably due to deletion of these sequences in this chromosome, do not allow to rule out the possibility of B have originated from another chromosome. Population genetic analysis *O. virens* showed three clusters, which exhibited relationship with aspects of the biology of the species, the landscape of the study sites and the geological changes occurred in northeastern of Brazil, in particular the formation of the Borborema and Araripe plateaus.

Keywords: Grasshopper; Chromosomal mapping; Single copy genes; B chromosome; Molecular diversity.

Lista de Ilustrações

Capítulo I.....	45
-----------------	----

Fig. 1 Cariogram based on meiotic cells (diplotene and metaphase I) presenting the location of single copy genes (arrowheads) on chromosome complement of grasshoppers species used in this study. **(a)** *Ommexecha virens*; **(b)** *Xyleus discoideus angulatus*; **(c)** *Tropidacris collaris*; **(d)** *Stiphra robusta*; **(e)** *Schistocerca pallens*. Bar = 10 µm. 62

Capítulo II.....	63
------------------	----

Figure 1. Characterization of B chromosomes in *Ommexecha virens*. **(a)** Conventional staining of metaphase I from an individual bearing 1B. Locations of 5S and 18S rDNA in **(b)** 1B and **(c)** 0B individuals. The 5S rDNA sites (green) are in the L1, L2, L3, and M4 pairs, and the 18S rDNA sites (red) are in L2, S9, and S10 pairs. H3 histone sites in S9 are shown in **(d)** and **(e)**. CMA3-positive blocks are shown in **(f)** 1B and **(g)** 0B. Note a similar pattern between S9 and B. **(h)** Idiogram showing 5S/18S rDNA, H3 histone, and CMA3-positive block distribution patterns in the chromosomal complement. Bar = 10 µm..... 67

Capítulo III.....	70
-------------------	----

Fig. 1 Mapa das populações de *O. virens* coletadas nos Estados de Pernambuco, Ceará e Bahia. 87

Fig. 2 Valores de delta K no que diz respeito ao K, de acordo com o método de Evanno et al. 2005. Estes resultados foram encontrados utilizando todos os 83 fragmentos de ISSR analisados. Note o pico mais alto de K = 3. 87

Fig. 3 Estrutura genética e ocorrência geográfica das populações de *O. virens* analisadas. a) Ascendência de cada indivíduo a qualquer um dos três grupos utilizando todos os 83 fragmentos gerados por ISSR, analisados pelo *software* Structure 2.3.1. b) Localização geográfica das oito populações utilizadas para a análise de ISSR ressaltando as topografias relacionadas às formações Chapada do Araripe e Planalto da Borborema. 88

Lista de Tabelas

Revisão da Literatura	15
Tabela 1. Agrupamento taxonômico para as famílias pertencentes à subordem Caelifera baseado em Song <i>et al.</i> (2015).....	18
Capítulo I.....	45
Table 1 Number of grasshoppers males specimens analyzed and geographical coordinates of collection places in the states of Pernambuco (PE), Piauí (PI), Paraíba (PB) and Bahia (BA) in the Northeastern region of Brazil.	58
Table 2 Chromosomal location of the conserved genes Heat shock response (<i>Hsps</i>), Ubiquitin (<i>Ubi</i>) and Lysozyme (<i>Lys</i>) in five species of neotropical grasshoppers (Acridomorpha). The <i>Hsp83</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Hsp27</i> , <i>Ubi</i> location for <i>S. pallens</i> was extracted from Rieger <i>et al.</i> (2007). *Maker in medium pair only.	59
Table 3 Chromosomal location of the single copy genes (<i>Hsp83</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Hsp27</i> , <i>Ubi</i> , <i>Lys</i> and Period [<i>Per</i>]) and repetitive copy (45S <i>rDNA</i> [45S], 5S <i>rDNA</i> [5S], <i>H3</i> or <i>H4 histone</i> [<i>H3</i> or <i>H4</i>] and <i>U1 snDNA</i> [<i>U1</i>]) in five species of Neotropical grasshoppers.....	60
Supplementary table Quantification of in situ hybridization signals for <i>Heat-shock proteins</i> (<i>Hsp83</i> , <i>Hsp70</i> and <i>Hsp27</i>), <i>Ubiquitin</i> (<i>Ubi</i>) and <i>Lysozyme</i> (<i>Lys</i>) genes on meiotic chromosomes of grasshoppers species utilized. Featured marks higher than 30%.	61
Capítulo II.....	63
Table 1. Localities of collections with geographical coordinates in the States of Pernambuco (PE) and Bahia (BA) in the Northeastern region of Brazil, and the number of individuals analyzed and 1B individuals of <i>Ommexecha virens</i> populations studied.	66
Capítulo III.....	70
Tabela 1 Populações e indivíduos coletados (N) de <i>O. virens</i> , localização geográfica, geomorfologia e paisagem dos Estados de Pernambuco (PE), Ceará (CE) e Bahia (BA), localizados no Nordeste brasileiro.	84
Tabela 2 Repetição nucleotídica, temperatura de pareamento (<i>T_a</i>), reprodutibilidade e valores de <i>PIC</i> , <i>MI</i> e <i>RT</i> dos <i>primers</i> ISSR utilizados neste estudo.	84
Tabela 3 Número total de fragmentos amplificados, porcentagem de loci polimórficos (P), diversidade genética de Nei (<i>h</i>), índice informativo de Shannon (<i>I</i>) e heterozigosidade esperada (<i>He</i>) estimados para as oito populações de <i>O. virens</i>	85

Tabela 4 Valores de identidade genética (acima da diagonal) e a distância genética (abaixo da diagonal) de Nei entre as populações de <i>O. virens</i>	85
Tabela 5 Valores de AMOVA para marcadores ISSR das oito populações analisadas do gafanhoto <i>O. virens</i>	85
Tabela 6 Valores par a par de F_{st} entre as populações estudadas de <i>O. virens</i>	85
Tabela 7 Parâmetros estatísticos para os diferentes modelos populacionais gerados a partir do <i>software</i> Hickory 1.1 para as oito populações de <i>O. virens</i> ...	86
Tabela 8 Diversidade e estruturação genética em populações de <i>O. virens</i> , fornecidos pelo Hickory 1.1 a partir do Full model. 2,5% e 97,5%, constituem o intervalo de confiança de 95%.	86
Tabela 9 Proporção de indivíduos de cada população atribuído a cada grupo pelo <i>software</i> Structure 2.3.1, com $K = 3$	86

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

2n	Número cromossômico diplóide
AFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados
B	Cromossomo B
COI	Citocromo oxidase subunidade I
DAMD	Amplificação direta de regiões minissatélite
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
H3	Histona H3
H4	Histona H4
HC	Heterocromatina constitutiva
<i>Hsp</i>	Gene de choque térmico
ISSR	Regiões entre sequências de repetições simples
L	Par cromossômico grande
<i>Lys</i>	Gene de lisozima
M	Par cromossômico médio
mtDNA	DNA mitocondrial
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Per</i>	Gene <i>Period</i>
PISH	Hibridização <i>in situ</i> permanente
RAPD	Polimorfismos de fragmentos de DNA aleatoriamente amplificados
<i>rDNA 45S</i>	Gene de DNA ribossomal 45S
<i>rDNA 5S</i>	Gene de DNA ribossomal 5S
RFLP	Polimorfismos dos Fragmento de Restrição
RON	Região Organizadora de Nucléolo
S	Par cromossômico pequeno
snDNA	DNA pequeno nuclear
SSR	Sequência de repetição simples
<i>Ubi</i>	Gene de ubiquitina
X	Cromossomo X
Y	Cromossomo Y

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Revisão da Literatura.....	15
2.1 Considerações gerais sobre gafanhotos acridomorfos neotropicais	15
2.2 Mapeamento cromossômico de sequências únicas e repetitivas em cromossomos de gafanhotos	21
2.3 Cromossomos B.....	28
2.4 Marcadores moleculares aplicados ao estudo da estrutura genética populacional em insetos.....	33
2.4.1 Marcadores <i>fingerprinting</i> de DNA com ênfase em ISSR (<i>Inter-simple Sequence Repeat</i>) na caracterização da diversidade genética de insetos ...	36
3. Objetivos	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Capítulo I. Comparative analysis of the chromosomal localization of single copy genes and repetitive sequences in five species of neotropical grasshoppers (Orthoptera: Acrodomorpha). Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Genetica</i>	45
5. Capítulo II. A small B chromosome in the grasshopper <i>Ommexecha virens</i> (Ommexechidae). Manuscrito publicado no periódico <i>Genetics and Molecular Research</i>	63
6. Capítulo III. Estrutura genética populacional do gafanhoto <i>Ommexecha virens</i> (Ommexechidae) oriundos de populações do Nordeste brasileiro. Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Journal of Insect Conservation</i> ..	70
7. Discussão Geral	89
8. Conclusões	96
9. Referências Bibliográficas	97
10. Anexos	111
11. Currículo <i>Lattes</i> atualizado (correspondente ao período do curso)	149

1. Introdução

Os gafanhotos (Orthoptera: Caelifera) são insetos que apresentam metamorfose incompleta (fases de ovo, ninfa e adulto), possuem formato, tamanho e coloração do corpo variável. Caelifera consiste em duas infraordens, das quais Acrididea possui oito superfamílias, e em sete delas (Acridoidea, Eumastacoidea, Proscopioidea, Pneumoroidea, Pyrgomorphoidea, Tanaoceroidea e Trigonopterygoidea) ocorrem os gafanhotos propriamente ditos e que compõem um grupo monofilético, denominado Acridomorpha. Os gafanhotos compreendem um grupo diverso com cerca de 9712 espécies, ampla distribuição e possuem interesse econômico e ecológico, sendo ainda modelo para estudos de sistemas biológicos.

Os estudos genéticos em gafanhotos foram realizados predominantemente com abordagem citogenética, com aproximadamente 330 espécies cariotipadas, sendo 76 destas sido analisadas por técnicas diferenciais e / ou moleculares. Do ponto de vista macrocromossômico observa-se um considerável grau de conservação, cariótipo $2n=23,X0$ e cromossomos acrocêntricos, sendo o mais frequente. Entretanto, cariótipos derivados que apresentam variação de número diploide, alteração de mecanismo sexual e de morfologia cromossômica foram registrados nas famílias Acrididae, Romaleidae, Proscopiidae, Ommexechidae, Pamphagidae, Tristiridae e Pyrgomorphidae entre outras. A análise convencional também permitiu a observação de polimorfismos, por exemplo, ocorrência de cromossomos supernumerários ou Bs. Por outro lado, os resultados de localização de bandas C e de sua composição, e de Regiões Organizadoras de Nucleolos (RONS) demonstraram variabilidade.

Nos últimos 20 anos têm sido realizados estudos de mapeamento cromossômico com sequências repetitivas (*rDNA 45S e 5S*, *Histona H3/H4*) através

de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A partir dos anos 2000 houve um considerável aumento no número de espécies analisadas, com o mapeamento das sequências citadas e o acréscimo de outras sequências (snDNA U1, fração Cot-1 do DNA, retroelementos RTE, sequência de DNA satélite e telomérica) nas análises. De modo geral, os dados de mapeamento têm sido úteis na compreensão da organização do genoma e da evolução cromossômica em gafanhotos e demonstraram uma variação microgenômica, cuja ocorrência tem sido atribuída em particular, a eventos do tipo recombinação ectópica e transposição. Quanto ao mapeamento de genes de cópia única (da família *Hsp*, *Ubiquitina* e *Period*) apenas dois estudos foram realizados através de hibridização *in situ* permanente (PISH) em apenas cinco espécies de gafanhotos, os dados demonstraram conservação quanto a localização das sequências.

Marcadores moleculares têm contribuído significativamente para a compreensão da base genética da diversidade dos gafanhotos. Acerca destes marcadores, podemos citar marcadores dominantes (*fingerprinting* de DNA, tais como RAPD, AFLP, DAMD e ISSR) e codominantes (DNA mitocondrial, sendo mais comumente usada sequências de COI).

Considerando a necessidade da melhor compreensão de aspectos evolutivos cromossômicos em gafanhotos acridomorfos, o presente trabalho propôs realizar o mapeamento de genes de cópia única (choque térmico e imunidade primária) nas espécies *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris*, *Stiphra robusta*, *Schistocerca pallens* e *Ommexecha virens*. Nesta última, analisar o cromossomo B e a estrutura genética populacional através de citogenética clássica e molecular e do marcador dominante ISSR, respectivamente.

2. Revisão da Literatura

2.1 Considerações gerais sobre gafanhotos acridomorfos neotropicais

Orthoptera é a ordem mais diversificada entre insetos da divisão Polyneoptera, que inclui todos os insetos ortopteróides, e apresenta mais de 25700 espécies descritas (Gillot, 2005; Song *et al.*, 2015). A ordem inclui insetos tais como grilos e gafanhotos, conhecidos como insetos-cantores; assim chamados por produzir sons através do mecanismo de estridulação onde ocorre o atrito das patas posteriores com o segundo par de asas.

Os gafanhotos são, constantemente, considerados pragas de cultivares e de pastagens, causando danos anuais consideráveis (Gallo *et al.*, 2002; Buzzi, 2005). Embora os Orthoptera sejam conhecidos por sua herbivoria, Micheneau *et al.* (2010) documentaram que espécies da família Gryllacrididae são potenciais polinizadores de espécies de orquídeas do gênero *Angraecum* (Vandaeae, Epidendroideae). Os Orthoptera se diversificaram em numerosas linhagens e ocupam o habitat terrestre fora das regiões polares, os mesmos desempenham um papel fundamental no ecossistema, servindo como base na alimentação de outros organismos da cadeia trófica, tais como aves, pequenos mamíferos e artrópodes, além de apresentar um papel relevante na fertilização do solo através da deposição de excrementos (Kevan, 1982; Buzzi, 2005). Esta diversidade tem atraído os pesquisadores que usam esses insetos como modelo para estudar sistemas biológicos em anatomia, fisiologia, genética e ecologia evolutiva (Chapman and Joern, 1990; Gangwere *et al.*, 1997; Pener e Simpson, 2009; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a; Song *et al.*, 2015).

A ordem Orthoptera está dividida em duas subordens: Ensifera (grilos) e Caelifera (gafanhotos). A principal característica que distingue estas subordens são

os órgãos de produção e percepção de sons que se encontram em diferentes partes do corpo (Alexander, 1960). Na subordem Caelifera, os tímpanos (órgãos auditivos) estão situados no primeiro segmento abdominal e na subordem Ensifera estes órgãos se encontram no protórax (Pfadt, 1994). A subordem Caelifera consiste em duas infraordens: Tridactylidea e Acrididea (Kevan, 1982). Acrididea compreende oito superfamílias: Acridoidea, Eumastacoidea, Proscopioidea, Pneumoroidea, Pyrgomorphae, Tanaoceroidea, Trigonopterygoidea e Tetrigoidea. As primeiras sete superfamílias são os gafanhotos propriamente ditos e, portanto, agrupados nos Acridomorpha, que corresponde a um grupo monofilético (Flook *et al.*, 1999; 2000; Song *et al.*, 2015).

Acridoidea é a maior superfamília dentro de Orthoptera e contém 11 famílias (Acrididae, Romaleidae, Ommexechidae, Tristiridae, Derycorythidae, Lathiceridae, Lentulidae, Lithidiidae, Pamphagidae, Pamphagodidae e Pyrgacrididae) e mais de 7900 espécies descritas a partir da análise da morfologia do complexo fálico masculino e da fenda basioccipital, entre outras características (Amédégnato, 1974; Kevan, 1982; Eades, 2000; Song, 2010; Song *et al.*, 2015). As relações filogenéticas entre as famílias pertencentes a Acridoidea têm sido alvo de discussões e reformulações. A maioria das hipóteses são baseadas em análises pré-cladísticas e há considerável quantidade de desacordos entre elas, mesmo para aquelas baseadas no mesmo conjunto de caracteres morfológicos (Song *et al.*, 2015).

Em 1975, a classificação taxonômica em Orthoptera sofreu modificações extremas quando Dirsh (1975) propôs a superordem Orthopteroidea com 10 novas ordens, gerando como consequências a instabilidade taxonômica que ainda perdura e a descrição de muitas espécies novas sob conflitantes padrões de

classificação (Song, 2010). Em relação às propostas taxonômicas mais recentes para Orthoptera, Leavitt *et al.* (2013) realizaram uma análise baseada em dados de genoma mitocondrial em representantes de superfamílias pertencentes à Caelifera, entretanto sua amostragem foi enviesada para Acrididae em comparação as análises para as outras linhagens. Song *et al.* (2015) baseados em genomas mitocondriais completos e quatro loci nucleares estabeleceram uma consistente filogenia para Orthoptera, incluindo 36 de 40 famílias, que representam todas as 15 superfamílias atualmente reconhecidas. Apresentaram ainda um agrupamento taxonômico para as famílias pertencentes a subordem Caelifera (Tabela 1).

Das 11 famílias de Acridoidea, Ommexechidae, Romaleidae e Tristiridae são endêmicas da região Neotropical com provável origem na América do Sul (Carbonell, 1977). Ommexechidae juntamente com Romaleidae formam um grupo monofilético, que divergiu a aproximadamente 76,74 milhões de anos, e que constitui o grupo irmão de Acrididae, o qual divergiu do ancestral de Ommexechidae e Romaleidae a aproximadamente 84,60 milhões de anos. Estas três famílias são, por sua vez, grupo irmão de Tristiridae, família que divergiu do ancestral comum das famílias Ommexechidae, Romaleidae e Acrididae a aproximadamente 94,09 milhões de anos (Leavitt *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015).

Acrididae é a maior família dentro de Acridoidea contendo aproximadamente 6.639 espécies de ocorrência mundial (Song *et al.*, 2015). As subfamílias do Velho Mundo (Calliptaminae, Cyrtacantharidinae, Oxyinae e Catantopinae) apresentam as características taxonômicas mais basais encontradas na descrição de Acrididae (Leavitt *et al.* 2013), o que sugere a origem da família no Velho Mundo, como proposto por Amédégno (1974).

Tabela 1. Agrupamento taxonômico para as famílias pertencentes à subordem Caelifera baseado em Song *et al.* (2015).

SubOrdem	InfraOrdem	Grupo de Superfamílias	Superfamílias	Famílias	Número de espécies descritas
Caelifera	Tridactylidea	Acridomorpha ^{gaf}	Tridactyloidea	Cylindrachetidae Ripterygidae Tridactylidae	205
			Tetrigoidea	Tetrigidae	1763
	Acrididea		Proscopioidea	Proscopiidae ^{neo}	214
			Eumastacoidea	Chorotypidae Episactidae Eumastacidae Euschmidtidae Mastacideidae Morabidae Thericleidae	1008
	Tanaoceroidea			Tanaoceridae	3
	Pneumoroidea			Pneumoridae	17
	Trigonopterygoidea			Trigonopterygidae Xyronotidae	21
	Pyrgomorphoidea			Pyrgomorphidae	473
	Acridoidea		Acrididae Derycorythidae Lathiceridae Lentulidae, Lithidiidae, Ommexechidae ^{neo} Romaleidae ^{neo} Tristiridae ^{neo} Pamphagidae Pamphagodidae Pyroacrididae	7976	

neo: Famílias de ocorrência exclusiva neotropical; **gaf:** grupo de superfamílias considerando os gafanhotos *strictu sensu* (Song, 2010).

Para Ommexechidae, o gênero *Ommexecha* é o que possui maior distribuição geográfica, sendo encontrado do Leste da Cordilheira dos Andes desde o Caribe até os 38 ° de latitude Sul, aproximadamente. Das seis espécies conhecidas, apenas *Ommexecha virens* apresenta grande variabilidade fenotípica, tanto morfológica quanto cromática, e ocupa praticamente a metade oriental da área de dispersão deste gênero. Os demais representantes, com exceção de *O. macropterum*, ocupam territórios ao largo do flanco oriental dos Andes. Este gênero é fileticamente próximo de *Descampsacris* e *Pachyossa*, é notadamente geofílico, associado à ambientes xerófilos (Ronderos, 1979; 1978). Segundo Ronderos

(1978) *O. servillei* e *O. germani* são sinônimos de *O. virens*; *O. caeruleans* de *O. macropterum* e *O. walkeri* de *O. gracilis*.

A família Romaleidae, com mais de 80 gêneros, é considerada uma das mais representativas da região Neotropical, ocupando habitats que vão desde florestas úmidas até a caatinga (Amédégnato, 1974; Carbonell, 1977). No Nordeste do Brasil estão amplamente distribuídos, com registro de ocorrência de diversos gêneros como, *Abila*, *Agriacris*, *Brasilacris*, *Chromacris*, *Colpolopha*, *Helionotus*, *Phaeoparia*, *Radacridium*, *Xestotrachelus*, *Xyleus* e *Tropidacris* (Rocha, 2002). O gênero *Xyleus* possui espécies que apresentam tamanho médio, com os maiores machos e fêmeas, respectivamente, de *X. rosulentus*, *X. mexicanus*, *X. discoideus* medindo de 44 a 49 mm e 62 a 70 mm, e os menores de *X. guarani* com aproximadamente de 31 a 32 mm e 37 a 40 mm em *X. moderatus* e *X. regularis* (Carbonell, 2004).

O gênero *Xyleus* é encontrado no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina, geralmente os representantes do gênero são considerados simpátricos, embora alguns sejam alopátricos (Carbonell, 2004). Outro gênero de Romaleidae que merece destaque é o *Tropidacris*, o qual compreende os maiores gafanhotos, atingindo até 14 centímetros de comprimento (Carbonell, 1986). Eles possuem uma forte influência sobre a cadeia alimentar como presas e predadores, contribuindo para a equilíbrio natural das populações (Nunes, 1996). É atribuído a *T. collaris* ataques especialmente a árvores como coqueiro, abacateiro, bananeira, limoeiro, mangueira, seringueira e, às vezes, a plantas ornamentais e cultivares de cana-de-açúcar, mandioca, algodoeiro e arroz (Poderoso et al., 2013).

Acrididae possui cerca de 25 subfamílias, segundo Eades et al. (2015), das quais quatro (Melanoplinae, Acridinae, Gomphocerinae e Oedipodinae) são

claramente de origem da região Neártica, com conexões com o resto do holoártico e da fauna do velho mundo em geral. Cinco subfamílias (Proctolabinae, Copiocerinae, Leptysminae, Rhytidochrotinae e Ommatolampinae) são exclusivamente neotropicais. Dentre as suas subfamílias, Cyrtacanthacridinae é composta por cerca de trinta gêneros, que estão distribuídos nas regiões Tropical e Subtropical.

O gênero *Schistocerca* (Cyrtacanthacridinae) apresenta um considerável número de espécies e subespécies distribuídas na América do Norte, Sul e Central (Dirsh, 1975), contudo sua origem é controversa. Há uma hipótese que considera que a origem de *Schistocerca* seja africana e que um ancestral comum da espécie, tenha migrado para as Américas (Carbonell, 1977). As espécies deste gênero, em especial *S. pallens*, são causadoras de sérios prejuízos à agricultura, devastando pastagens e plantações, principalmente de milho e feijão (Barrientos, 1995; Magalhães e Lecoq, 2006). As mais recentes aparições ocorreram no final do século passado, de 1986 a 1994. As principais zonas infestadas encontram-se nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco no Nordeste Brasileiro (Magalhães e Lecoq, 2006).

A superfamília Proscopioidea compreende uma única família, Proscopiidae de ocorrência neotropical exclusiva, originada a 183,82 milhões de anos, aproximadamente (Song *et al.*, 2015), embora esta família, por vezes, tenha sido considerada como pertencente à Eumastacoidea (Eades, 2000). Matt *et al.* (2008), baseados em sequências de genes ribossomais mitocondriais (12S e 16S) e nucleares (18S e 28S) discutiram a posição de Proscopiidae, que se mostrou ambígua, onde nenhuma análise apresentou consenso de suporte para Proscopiidae dentro de qualquer dos ramos existentes em Eumastacoidea: parte

dos resultados colocaram Proscopiidae relacionada com Eumastacoidea e parte indicaram que eles estão em superfamílias separadas. Song *et al.* (2015) elevaram o *status* de Proscopiidae e consideraram Proscopioidea como uma superfamília separada com base em apomorfias únicas, tais como lobos ventrais apendiculados sobre os ápices dos fêmures metatóraxicos, perda do órgão timpânico-auditivo e ausência do cryptopleuron (Heads, 2008), bem como a sua robusta posição basal em relação a outros Eumastacoidea.

Os gafanhotos pertencentes à família Proscopiidae são conhecidos como manés-magros, taquarinhas, entre outros. Possuem corpo alongado, cabeça cônica alongada para a frente e asas ausentes ou curtas, as quais não capacitam o voo (Jago, 1989). A família possui 31 gêneros e 214 espécies (Eades *et al.* 2015; Song *et al.*, 2015) e apresentam distribuição exclusivamente Neotropical, com ocorrência em lugares áridos a florestas (Domenico, 2007). O gênero *Stiphra* possui 12 espécies e dentre elas *S. robusta* apresenta distribuição restrita ao Nordeste Brasileiro (Magalhães e Lecoq, 2006). Alguns representantes Proscopiidae são considerados pragas esporádicas, principalmente em regiões mais áridas, como a caatinga do nordeste do Brasil (Lima e Andrade, 2002). *Stiphra robusta* apresenta registros de comportamento de praga junto com outras espécies de Proscopiidae pertencentes aos gêneros *Cephalocoema*, *Tetanorhynchus* e *Proscopia* (Magalhães e Lecoq, 2006; Domenico, 2007).

2.2 Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas e únicas em cromossomos de gafanhotos

Estudos citogenéticos em gafanhotos até o ano 2000, em geral, enfocaram a citogenética clássica (Rufas *et al.*, 1985, Cabrero e Camacho 1986, Santos e Fox,

1988; Viseras *et al.*, 1991; Souza e Kido, 1995; Rocha *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 1998; Pereira e Souza, 2000). Para Acridomorpha, foram realizados estudos cariológicos em aproximadamente 330 espécies, sendo 216 representantes de Acrididae, 47 de Romaleidae, 29 de Proscopiidae, 20 de Ommexechidae, nove de Pamphagidae, oito de Tristiridae e uma espécie de Pyrgomorphidae (White, 1973; Mesa e Ferreira, 1977; 1978; Hewitt, 1979; Mesa e Ferreira, 1981; Mesa *et al.*, 1982; Bugrov e Gozeva, 1998; Castillo *et al.*, 2010), compreendendo cerca de 3,4% das espécies descritas para este grupo.

Gafanhotos Acridoidea exibem uma estabilidade cariotípica aparente, com a maioria das espécies com o cariótipo modal ($2n = 23♂; 24♀$) com cromossomos acrocêntricos e mecanismo de determinação sexual $X0; XX$. Apesar da conservação macrocromossômica existem diversas espécies com cariótipos derivados, sendo o exemplo clássico por apresentar o menor número cromossômico a espécie *Dicroplus silveiraguidoi* com $2n = 8$, neo-XY (Cardoso e Dutra, 1979). Pyrgomorphidae e Pamphagidae apresentam um cariótipo básico de $2n = 19♂; 20♀$, com todos os cromossomos acrocêntricos (Castillo *et al.*, 2010). Em Ommexechidae, o maior par autossômico é submetacêntrico na maioria das espécies e é resultante de uma inversão pericêntrica no par um ancestral (Mesa e Ferreira 1977). Para Procopiidae o número cromossômico varia de $2n = 15$ a $2n = 19$, com cromossomos acrocêntricos na maioria das espécies, e mecanismo sexual $X0$ (Mesa e Ferreira 1978; Moura *et al.*, 1996; Souza e Moura, 1999).

Em relação às técnicas diferenciais como bandeamento C e impregnação com nitrato de prata, geralmente utilizadas para a caracterização cromossômica da heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo (RONS), respectivamente, foram analisadas cerca de 59 espécies de Acrididae (Cabrero e

Camacho, 2008; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a; Oliveira *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013), 10 de Romaleidae (Souza e Kido, 1995; Rocha *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 1998; Pereira e Souza, 2000; Souza *et al.*, 2003; Loreto *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2015), quatro de Proscopiidae (Moura *et al.*, 1996; Souza e Moura, 1999) e três de Ommexechidae (Carvalho *et al.*, 2011).

Em representantes de Acrididae, Romaleidae, Ommexechidae e Proscopiidae neotropicais, o padrão predominante de localização cromossômica dos blocos de heterocromatina constitutiva é pericentromérico (Souza e Kido 1995; Rocha *et al.*, 1997; Loreto e Souza, 2000; Rocha *et al.*, 2004; Loreto *et al.*, 2005; Souza e Melo 2007; Carvalho *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2015), embora ocorra variação na localização das bandas C. Quanto a localização das RONS, a maioria das espécies apresentaram marcações nas regiões proximais ou pericentroméricas de cromossomos autossômicos e sexuais (Cabrero e Camacho, 2008, Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b; Carvalho *et al.*, 2011; Neto *et al.*, 2013).

Em gafanhotos, os estudos de mapeamento através da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram predominantemente realizados com sondas de famílias multigênicas, de DNA ribossomal (*rDNA*) 45S em cerca de 69 espécies distribuídas em 53 representantes da família Acrididae (Cabrero e Camacho, 2008, Oliveira *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2015); 10 de Romaleidae (Souza *et al.*, 1998; Pereira e Souza, 2000; Souza *et al.*, 2003; Loreto *et al.*, 2005; Anjos *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015); quatro de Proscopiidae (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b) e duas de Ommexechidae (Carvalho *et al.*, 2011); com sondas *rDNA* 5S em cerca de 48 espécies distribuídas em 36 espécies de Acrididae (Loreto *et al.*, 2008; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a; Oliveira *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2015), sete de Romaleidae (Loreto *et al.*, 2008; Anjos *et al.*, 2013;

Neto *et al.*, 2013); quatro de Proscopiidae (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b) e uma de Ommexechidae (Souza *et al.*, 2015); e com *histona H3/H4* em cerca de 55 espécies, sendo 41 de Acrididae (Cabrero *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2015); nove de Romaleidae (Anjos *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2015) quatro de Proscopiidae (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b) e uma de Ommexechidae (Souza *et al.*, 2015).

Variação quanto a quantidade de sítios cromossômicos e localização tem sido observadas para os sítios de *rDNA 45S* em gafanhotos das famílias Acrididae, Romaleidae e Proscopiidae, com ocorrência de um a oito pares cromossômicos portadores de sítios de *rDNA 45S* (Cabral-de-Mello e Martins, 2010), com localização em autossomos e / ou no X, e presença desse tipo de sequência em cromossomos B (Cabrero e Camacho, 2008; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b). Esta notável variação tem sido mais comum para Acrididae, que é a família com mais espécies estudadas, onde a variação de sítios cromossômicos foi em média 2,47 (Cabrero e Camacho, 2008).

Em quatro espécies neotropicais de gafanhotos Gomphocerinae (Acrididae) *Amblytropidia sp.*, *Cauratettix borelli*, *Compsacris pulcher* e *Orphulella punctata*, Silva-Neto *et al.* (2015) identificaram um único sítio de *rDNA 45S* no cromossomo 9 de *Amblytropidia sp.* e *Cauratettix borelli*; no cromossomo 6 de *Compsacris pulcher*, e dois sítios nos cromossomos 1 e 2 de *Orphulella punctata*. Duas espécies de Ommexechidae, *Ommexecha virens* e *Descampsacris serrulatum* apresentaram três e quatro sítios de *rDNA 45S*, respectivamente (Carvalho *et al.*, 2011). Nas quatro espécies de Proscopiidae analisadas foi observado um sítio no sétimo par cromossômico, indicando uma condição ancestral para este par como portador do *cluster rDNA 45S* primitivo e sítios adicionais presentes nas espécies

Stiphra robusta e *Tetanorhynchus silvai* (Cabral-de-Mello et al., 2011b). Em Romaleidae, foi observado um sítio cromossômico em *Chromacris nuptialis*, *C. speciosa*, *Xestotrachelus robustus*, *Brasilacris gigas* (Souza et al., 2003; Loreto et al., 2005; Neto et al., 2013), *Xyleus discoideus angulatus* (Souza et al., 1998) e *Radacridium mariajoseae* (Anjos et al., 2013); dois sítios em *Tropidacris collaris* e *T. cristata grandis* (Rocha et al., 2015) e três sítios em *R. nordestinum* (Anjos et al., 2013).

Em Acrididae, o número de sítios de *rDNA* 5S variou de apenas um sítio nas espécies (*Pezotettix giornae*, *Heteracris adspersa*, *Chorthippus apicalis*, *Stauroderus scalaris*, *Oedipoda coerulescens* e *Tropidopola graeca*) à sítios em todos os cromossomos do complemento (*Chorthippus binotatus*, *Ch. jacobsi*, *Ch. nevadensis*, *Omocestus bolivari* e *Sphingonotus azurescens*). Algumas espécies apresentaram variações da localização cromossômica dos sítios: 75% dos sítios proximais (próximo ao centrômero), 21,6% intersticiais (região entre o centrômero e telômero), e 3,4% distais (próximo ao telômero) (Cabral-de-Mello et al., 2011a). Além disso, verificou-se a presença de sítios *rDNA* 5S em cromossomo B (Cabrero et al., 2003; Oliveira et al., 2011).

Uma dispersão dos sítios de *rDNA* 5S foi visto em quatro espécies Gomphocerinae, com variações intra-específica: *Amblytropidia sp* teve de seis a oito sítios em autossomos, enquanto *C. pulcher* exibiram um sinal apenas no cromossomo 5 (Silva-Neto et al., 2015). Em quatro representantes de Romaleidae (*Chromacris nuptialis*, *C. speciosa*, *Xestotrachelus robustus* e *Brasilacris gigas*) analisados por Neto et al. (2013), foram observados dois padrões de distribuição dos sítios de *rRNA* 5S, sítio restrito a um único par de cromossomos, e dois sítios são localizados em diferentes pares de cromossomos, sendo observados seis sítios

no total. Em duas espécies de Romaleidae foram vistos de dois a quatro sítios de *rDNA* 5S, distribuídos nos pares cromossômicos 1, 2 e X (*Radacridium mariajoseae*) e 2, 3, 4 e 5 (*R. nordestinum*). Nas espécies representantes de Proscopiidae analisadas, os sítios de *rDNA* 5S foram localizadas na região pericentromérica do quarto par cromossômico em *Scleratoscopia protopeirae*, *S. spinosa*, *Stiphra robusta* e *Tetanorhynchus silvai* (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b).

Em relação às localizações dos genes de *histona H3 / H4*, foi observada para Acrididae a presença de apenas um sítio cromossômico, que além disso, apresenta uma conservação notável em relação à posição cromossômica (Cabrero *et al.*, 2009). Nesta família, a maioria das espécies com $2n=23,X0$ apresentaram o sítio na região intersticial do cromossomo 8. Por outro lado, a localização da *histona H3* no cromossomo 3 de espécies com $2n=17,X0$, resultante de fusões cêntricas, foi observada em espécies de diferentes gêneros de Gomphocerinae (Cabrero *et al.*, 2009). Em quatro espécies de Gomphocerinae neotropicais, o gene *histona H3* foi restrito a um único par autossômico nas espécies analisadas (Silva-Neto *et al.*, 2015).

Para Romaleidae foi visto uma dispersão da *histona H3*, cuja localização do sítio foi observada no par cromossômico 2 em *Chromacris nuptialis*, *C. speciosa* e *Xestotrachelus robustus* e no par 9 em *Brasilacris gigas* (Neto *et al.*, 2013); nos pares cromossômicos 2, 4 e X em *Xyleus discoideus angulatus* (Machado *et al.*, 2014); nos pares cromossômicos 6, 10 e 11 em *Tropidacris collaris* em 14 pares autossômicos e no cromossomo X em *T. cristata grandis* (Rocha *et al.*, 2015). Em quatro espécies de Proscopiidae analisadas, o sítio foi observado no quarto par cromossômico, co-localizados com sítios de *rDNA* 5S (Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b).

Alguns trabalhos de mapeamento de outras sequências repetidas foram realizados, por exemplo, com DNA satélite em *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero *et al.*, 2003); com sequências de microssatélites no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Milani e Cabral-de-Mello, 2014); com sequências moderadamente e altamente repetitivas através da fração Cot-1 do DNA em seis espécies da subfamília Melanoplinae (Palacios-Gimenez *et al.*, 2013) e acerca da distribuição intracromossômica de retroelementos RTE no gafanhoto *E. plorans* (Montiel *et al.*, 2015). De modo geral, os dados de mapeamento têm sido úteis na compreensão da organização do genoma e da evolução cromossômica em gafanhotos.

Outra classe de genes localizada em cromossomos de gafanhotos é o DNA pequeno nuclear *U1* (snDNA), relacionado com a maquinaria de maturação do pré-RNA mensageiro, o spliceossomo (Bringmann e Lührmann, 1986; Valadkhan, 2005). O gene *U1* foi localizado cromossomicamente em espécies pertencentes às famílias Proscopiidae, Pyrgomorphidae, Ommexechidae, Romaleidae e Acrididae com uma considerável conservação nas quatro primeiras famílias, com a maioria das espécies portando único *cluster* gênico *U1*, frequentemente localizado no par autossômico 3 ou 4. Por outro lado, uma notável variação foi observada em Acrididae, onde foi observado a presença de um *cluster* em um único par cromossômico a todos os pares, com eventual ocorrência de dois ou mais *clusters* no mesmo cromossomo (Anjos *et al.*, 2015).

Trabalhos acerca da localização de genes de cópia única por hibridização *in situ* não-fluorescente permanente (PISH) em gafanhotos são escassos, sendo restritos ao mapeamento dos genes de cópia única *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27* e *Ubi* (Rieger *et al.*, 2007) e *Period* (Souza *et al.*, 2014).

Os genes *Hsp* sintetizam um grupo de proteínas chamadas proteínas de choque térmico (HSP) que foram primeiramente caracterizadas durante respostas à elevação de temperatura entretanto agentes químicos e físicos podem também gerar um rápido aumento na síntese desse conjunto de polipeptídios conservados (Feder and Hofmann, 1999; Zhao e Jones, 2012); o gene de ubiquitina (*Ubi*) (Rieger *et al.*, 2007), que além de apresentar comportamento de HSP (Lindquist, 1986) também participa dos processos de reparação de danos ao DNA e de sinalização para endocitose (Zhang e Matunis, 2005); o gene de lisozima (*Lys*) (Souza *et al.*, 2014), o qual é importante para a imunidade em Orthoptera, em particular a defesa primária (Adamo, 2004; 2010); e o gene Period (*Per*), importante gene do ciclo circadiano (Souza *et al.*, 2014). Em ambos os estudos (Rieger *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2014) realizados nas espécies *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris*, *Schistocerca pallens* e *Stiphra robusta*, foi observado uma predominância da localização desses genes em cromossomos de tamanho grande (pares cromossômicos 1 e 2), embora marcas adicionais tenham sido vistas em cromossomos médios (pares cromossômicos 4, 5 e 8).

2.3 Cromossomos B

Cromossomos B são cromossomos extras adicionados ao complemento cromossômico padrão da espécie, que corresponde aos cromossomos A. Ocorrem em diferentes grupos de animais e plantas e podem se originar de diferentes maneiras, incluindo derivação de autossomos (Jamilena *et al.*, 1995), cromossomos sexuais (López-León *et al.*, 1994) e cruzamentos intra (Houben *et al.*, 1996) e interespecíficos (McAllister e Werren, 1997). A sua evolução molecular assemelha-se à de cromossomos sexuais univalentes, que envolvem o

silenciamento de genes, a heterocromatinização e acumulação de DNAs repetitivos, dentre eles os transposons (Camacho *et al.*, 2000).

Cromossomos B foram considerados geneticamente inertes, uma vez que experimentos com uridina tritiada revelaram escassa incorporação da mesma em cromossomo B nos gafanhotos *Myrmeleotettix maculatus* e *Chorthippus parallelus* (Fox *et al.*, 1974) e no camundongo *Apodemus peninsulae* (Ishak *et al.*, 1991). Em geral, os cromossomos B ocorrem em alguns indivíduos de uma espécie e tipicamente têm mecanismos de acumulação, que aumentam a sua transmissão antes, durante, ou após a gametogênese (Nur, 1962; 1977; Perfectti e Werren, 2001). No que diz respeito a manutenção do cromossomo B no genoma da espécie, sabe-se que o mesmo possui a capacidade de transmissão a partir de uma variedade de mecanismos e uma alta frequência de mutação, expandindo assim a sua variabilidade e promovendo a sua evolução (Jones, 1991).

A principal estratégia de cromossomos A para minimizar o acúmulo de Bs é a expressão de genes supressores que exercem controle destes cromossomos (Perfectti *et al.*, 2004). Por exemplo, no gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus*, um gene que altera a taxa de transmissão de cromossomo B apresenta polimorfismo nas populações analisadas (Shaw e Hewitt, 1985) e na cochonilha, *Pseudococcus affinis*, Nur e Brett (1987) demonstraram que as linhagens de transmissão dos cromossomos B, que eles haviam anteriormente obtido por seleção artificial, diferia em dois loci não ligados com efeitos aditivos sobre a taxa de transmissão de cromossomo B.

O acúmulo de elementos repetitivos nos cromossomos B está diretamente associado a sua natureza heterocromática e ausência de recombinação com os cromossomos A (Beukeboom, 1994; Camacho *et al.*, 2000). A presença de

elementos transponíveis do genoma está sendo detectada em vários cromossomos B (Camacho, 2005), podendo, além de causar a inativação de genes, modificar a ordem e estrutura gênica e ocasionar a degeneração gradual deste cromossomo (Camacho *et al.*, 2000), bem como estar relacionado com sua origem e evolução.

A prevalência de cromossomos B em 1601 espécies cariotipadas de ortópteros foi analisada por Palestis *et al.* (2010). Cromossomos B foram relatados em 191 destas espécies e apresentam distribuídas entre as superfamílias de Orthoptera, com 32,3% de espécies com B em Pyrgomorphoidea, 14,9% em Grylloidea, 14,3% em Tetrigoidea e 14,6% em Acridoidea. Foi observado ainda predominância de Bs em cariótipos com número cromossômico de $2n=24$ e com cromossomos acrocêntricos. Embora a presença de cromossomos B nos gafanhotos seja frequente, análises mais aprimoradas em relação à composição são basicamente restritas às espécies *Eyrepocnemis plorans* (López-León *et al.*, 1993; Bakkali *et al.*, 2001; Cabrero *et al.*, 2003) *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010) e espécies do gênero *Podisma* (Bugrov *et al.*, 2007), além de alguns estudos em gafanhotos sul-americanos, tais como *Rhammatocerus brasiliensis* (Loreto *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011) e *Xyleus discoideus angulatus* (Loreto *et al.*, 2008), *Dichroplus pratensis* (Bidau *et al.*, 2004) e *Abracris flavolineata* (Bueno *et al.*, 2013).

Dentre as espécies de gafanhotos que possuem cromossomo B, *Eyrepocnemis plorans* (Acrididae) destaca-se por apresentar mais de 50 tipos de B nas populações do Velho Mundo, costas mediterrânicas e atlânticas da Península Ibérica e Norte da África (Camacho *et al.*, 2003). Nesta espécie, foram realizados diversos estudos, por exemplo, a análise da origem dos Bs por dupla-FISH em diferentes populações por Cabrero *et al.* (1999); testada a possibilidade de origem

intraespecífica de cromossomos B em *E. plorans*, derivados do cromossomo X, baseada na correspondência de sequências de DNA ribossomal e DNA satélite, utilizando técnica de microdissecção e pintura cromossômica por Teruel *et al.* (2009); caracterizada uma região genômica de 1510 pb específica de indivíduos portadores de cromossomo B (SCAR) por Munoz-Pajares *et al.* (2011) e observaram que os nucléolos ligados a cromossomos B são formados por expressão do rDNA localizados nos Bs por Ruiz-Estevez *et al.* (2012).

Além de *E. plorans*, outras espécies de Acrididae do Velho Mundo têm sido utilizadas como modelo para análises de cromossomos B, tal como espécies *Podisma kanoi*, *P. sapporensis* (Bugrov *et al.*, 2007) e *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2010). Dentre estas análises realizadas destacam-se o mapeamento de genes repetitivos, tais como DNA ribossomal e genes de histona e pintura cromossômica dos B microdissecados, além do uso de clones contendo DNAs repetitivos.

No que diz respeito ao estudo populacional de gafanhotos neotropicais portadores de cromossomos B, *A. flavolineata* (Acrididae), foi recentemente investigada por técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, com sondas de rDNA 5S, 45S, histona H3, snDNA U1 e U2, sequências teloméricas e fração de Cot-1 do DNA por Bueno *et al.* (2013). Este estudo sugeriu a possível origem deste cromossomo a partir do par cromossômico 1 pela correspondência dos sítios de snDNA U2. Milani e Cabral-de-Mello (2014) utilizaram FISH para mapear a distribuição de 16 unidades repetitivas de microssatélites, com repetições mono, di, tri e tetranucleotídicas em *A. flavolineata*. Segundo os autores, os microssatélites compõem o cromossomo B e podem estar envolvidos na evolução deste elemento, embora nenhuma relação específica com qualquer cromossomo A foi observada.

Em populações de *X. discoideus angulatus* (Romaleidae) (Loreto *et al.*, 2008) e *R. brasiliensis* (Acrididae) (Loreto *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011), o cromossomo B em ambas espécies mostrou-se semelhante ao cromossomo X em morfologia, porém os resultados de FISH de *rDNA* 5S e 45S apresentam uma origem autossômica desses cromossomos. Machado *et al.* (2014) analisaram nove populações do gafanhoto *X. d. angulatus* no Nordeste brasileiro portadoras de cromossomo B e não observou correspondência dos sítios de *rDNA* 45S e *histona H4* nos cromossomos B, sugerindo que os cromossomos B desta espécie não se originou a partir de qualquer um dos quatro cromossomos portadores de genes de *rDNA* 45S (par cromossômico 3 e cromossomo X) e *histona H4* (pares cromossômicos 2, 4 e X).

Em *R. brasiliensis* foi analisada a ocorrência de cromossomos B em nove populações do nordeste brasileiro (Loreto *et al.*, 2008) e foi observado que os Bs são amplamente distribuídos nesta região, e que a pequena quantidade de variação interpopulacional encontrada para prevalência de B sugere a existência de alto fluxo gênico, provavelmente devida à abundância desta espécie de gafanhoto em vários tipos de vegetação e sua relativamente alta capacidade de voo. Oliveira *et al.* (2011) observou em *R. brasiliensis* sítios de *rDNA* 5S em todos os cromossomos do complemento padrão (exceto no par 11) e no cromossomo B. Além da dispersão do *rDNA* 5S também foi observado co-localização deste sítio com sítio de *histona H3* em todos os cromossomos, inclusive o B.

Na espécie de gafanhoto *D. pratensis* (Acrididae) dois tipos distintos de cromossomos B foram relatados (Bidau, 1987), dos quais um deles apresenta ocorrência de *rDNA* 45S compartilhado com o par cromossômico 8, em análise de nove populações argentinas (Bidau *et al.*, 2004); no entanto, os resultados da FISH

não demonstraram a existência de cístrons ribossômicos inativos no cromossomo X, como sugerido anteriormente, descartando, assim, qualquer apoio de origem do B a partir do cromossomo X.

2.4 Marcadores moleculares aplicados ao estudo da estrutura genética populacional em insetos

Os primeiros tipos de marcadores genéticos desenvolvidos foram baseados em fenótipo, inicialmente estudados em *Drosophila*, o que levou à criação da teoria de ligação genética; porém as limitações destes tipos de marcadores genéticos induziram o desenvolvimento de marcadores mais gerais e úteis, baseados em DNA, que ficaram conhecidos como marcadores moleculares (Schlötterer, 2004; Agarwal *et al.*, 2008; Jonah *et al.*, 2011). Um marcador molecular é definido como um segmento específico de DNA que é representativo acerca das diferenças ao nível de genoma (Agarwal *et al.*, 2008).

O marcador molecular ideal deve atender vários critérios dentre os quais: ser polimórfico e uniformemente distribuído pelo genoma (Navajas e Fenton, 2000); proporcionar uma resolução adequada das diferenças genéticas (Schlötterer, 2004); possuir protocolos simplificados e com baixo custo financeiro (Wan *et al.*, 2004); necessitar de pequenas quantidades de DNA (Behura, 2006); apresentar herança codominante (Semagn *et al.*, 2006); ter ligação com fenótipos distintos (Agarwal *et al.*, 2008) e não necessitar de informação prévia sobre o genoma de um determinado organismo (Teneva, 2009). Nenhum marcador molecular conhecido até o presente abrange todos os critérios mencionados. Cada tipo de marcador difere uns dos outros com relação a fatores importantes, como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado, especificidade,

reprodutibilidade, requisitos técnicos e de custo (Reddy *et al.*, 2002; Anne, 2006; Hausdorf e Hennig, 2010).

Numerosos marcadores à base de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase) foram descritos na literatura, podendo ser classificados em: marcadores multilocus (apresentando vários *loci* no genoma); marcadores *single-locus* (marcador que deriva a partir de um único locus no genoma); marcadores dominantes (a análise é contabilizada como presença ou ausência, e assim, não permite a identificação de alelos homólogos) e marcadores codominantes (permite a identificação dos alelos homólogos, por conseguinte de homozigotos e heterozigotos) (Mueller e Wolfenbarger, 1999; Schlötterer, 2004; Agarwal *et al.*, 2008).

Em insetos, estudos de genética populacional são realizados a partir de vários tipos de marcadores moleculares baseados em PCR, tais como mtDNA (DNA mitocondrial) (Schutze *et al.*, 2012; Chahbar *et al.*, 2013; Ré *et al.*, 2014; Wilson, 2015); marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*; sequência de repetição simples; microssatélites) (Phillipsen e Lytle, 2013; Schmid-Hempel *et al.*, 2014; Egizi e Fonseca, 2015) e marcadores *fingerprinting* de DNA, tais como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*; polimorfismo de sequência de DNA randomicamente amplificada) (Sesarini e Remis, 2008; Miño *et al.*, 2011); AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*; polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados) (Lee *et al.*, 2011; Sekar e Karanth, 2013; Gradish *et al.*, 2015) e ISSR (*Inter simple sequence repeat*; regiões entre sequências de repetições simples) (Mendki *et al.*, 2011; Manrique-Poyato *et al.*, 2013; 2015). Com exceção do RAPD, os marcadores citados anteriormente têm sido recentemente utilizados. Embora haja vantagens inerentes e desvantagens associadas com cada

tipo de marcador, a escolha de sua aplicação depende principalmente dos objetivos de um determinado estudo (Behura, 2006).

Dentre os marcadores codominantes, o mtDNA é utilizado devido à alta taxa mutacional e considerável polimorfismo de determinadas regiões (Zhang e Hewitt, 1997). Em insetos, uma outra vantagem da utilização do mtDNA é que diversos *loci* podem ser facilmente amplificados utilizando *primers* universais concebidos a partir de genes mitocondriais conservados (Kambhampati e Smith 1995; Lunt *et al.*, 1996; Zhang e Hewitt 1997; Lanave *et al.*, 2002). Por outro lado, em diversos estudos de genética populacional de insetos, os marcadores mtDNA são de difícil interpretação pois pode ocorrer inserções de sequências nucleotídicas do genoma de parasitas (Ex. *Wolbachia sp.*) em regiões do genoma mitocondrial (Behura *et al.*, 2001; Hurst e Jiggins 2005) e inserções de sequências mitocondriais no genoma nuclear (Zhang e Hewitt, 1996; Bensasson *et al.*, 2000; 2001).

Em uma revisão de estudos biogeográficos em vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e insetos que utilizaram marcadores mitocondriais e nucleares, Toews e Brelsford (2012) identificaram padrões biogeográficos conflitantes quando comparados os dados obtidos por marcadores mitocondriais e nucleares (discordância mito-nuclear). Estes autores sugeriram que as diferenças observadas devem ter como causa, principalmente, efeitos ligados ao mtDNA, tais como introgressão adaptativa, disparidades demográficas, assimetrias tendenciosas do sexo, migração de indivíduos em zonas híbridas, introduções humanas e infecção por *Wolbachia* em insetos.

Outro marcador codominante amplamente utilizado na caracterização da estrutura genética populacional de insetos são os microssatélites (Behura, 2006). Um considerável número de microssatélites podem ser isolados através da geração

de biblioteca genômica, amplificados por PCR ou gerados pela digestão parcial de DNA genômico (Lunt *et al.*, 1999) e “enriquecida” com sequências de repetições simples (Ostrander *et al.*, 1992; Kandpal *et al.*, 1994). Entretanto, o custo envolvido nas análises de microssatélites é consideravelmente elevado quando comparado a outros marcadores como os do tipo *fingerprinting* de DNA. Além disso é necessário um número de genótipos elevado para análises estatísticas significativas e, em alguns casos, não são marcadores genéticos neutros, sendo observado seu envolvimento na regulação gênica e na seleção diferencial dependente do sexo (Schlötterer, 2000; Li *et al.*, 2002; 2004).

2.4.1 Marcadores *fingerprinting* de DNA com ênfase em ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*) na caracterização da diversidade genética de insetos

Dentre os marcadores dominantes, também classificados como marcadores *fingerprinting*, podemos exemplificar o RAPD (Kumar e Gurusubramanian, 2011) como um dos primeiros a ser desenvolvido, e ISSR (Wolfe, 2005) que se apresentam adjacentes e opostamente orientados aos microssatélites (Schlötterer, 2004). Alternativamente, os fragmentos de restrição podem ser amplificados pela adição de ligantes e amplificação seletiva subsequente, no caso dos AFLP (Mueller e Wolfenbarger, 1999). Todos estes marcadores têm como produtos de amplificação múltiplos fragmentos de DNA que podem variar dentre presença / ausência entre diferentes indivíduos. Uma das principais vantagens de marcadores dominantes é que não exigem conhecimento *a priori* sobre o genoma das espécies alvo (Teneva, 2009). Por outro lado, a principal desvantagem da utilização destes marcadores é o padrão de herança dominante dos dados obtidos (Hollingsworth e Ennos, 2004).

Assim como outros marcadores *fingerprinting* de DNA, o ISSR também é fundamentado em PCR, especificamente a partir de *primers* únicos baseados em repetições di, tri ou tetra-nucleotídicas (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe e Liston, 1998). O número de repetições varia, mas a sequência tem em geral o tamanho de pelo menos 14 nucleotídeos (Vijayan, 2005). O ISSR é baseado na amplificação de um segmento de DNA localizado entre duas regiões de sequência de repetições simples (*simple sequence repeat*; SSR; microssatélites). Esta técnica é considerada de baixo custo sendo usada na determinação da diversidade genética devido ao alto grau de polimorfismo gerado através de um perfil multilocus (Wolfe *et al.*, 1998). Além disso, este marcador tem a vantagem de ser distribuído de forma não-ubíqua aos microssatélites no genoma eucariótico (Ratnaparkhe *et al.*, 1998).

A técnica de ISSR gera um número maior de polimorfismos por *primer* se comparada a outros marcadores dominantes como o RAPD. Teoricamente, esse aumento no índice de polimorfismo se deve aos *primers* ISSR serem direcionados às regiões com maior grau de variabilidade do genoma. Além disso, o ISSR apresenta outras vantagens como menor tempo para a aplicação do protocolo quando comparado a técnicas como o AFLP e também não demanda de um alto custo financeiro como para o desenvolvimento de marcadores microssatélites convencionais (McGregor *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 2002).

Inicialmente os marcadores ISSR foram desenvolvidos para estudos de plantas cultivadas (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Contudo, dada a sua natureza polimórfica combinada aos requisitos mínimos de equipamentos e facilidade de uso, estes marcadores também se tornaram extremamente úteis para diversas inferências ecológicas e de genética populacional (Pazza *et al.*, 2007;

Boylan *et al.*, 2009; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2011; Mahar *et al.*, 2013).

Os marcadores ISSR têm sido usados para estudos da diversidade genética de distintos grupos de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Orthoptera. Tais análises são abrangentes abordando temas como a caracterização da diversidade genética de populações naturais, inclusive espécies-praga (Mendki *et al.*, 2011; Manrique-Poyato *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015), estudo da diversidade genética de linhagens de insetos de interesse econômico (Velu *et al.*, 2008), identificação de espécies (Hundsdoerfer *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2010) além de estudos direcionados a conservação de espécies naturais através da análise das alterações genéticas ocasionadas pela fragmentação de habitats (Vandergast *et al.*, 2009).

Acerca dos estudos de diversidade genética com marcadores ISSR em populações naturais, De León e Jones (2005) estimaram a estrutura genética populacional de *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae), o principal parasitóide de *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). Seis populações de *G. ashmeadi* dos Estados Unidos e uma da Argentina foram analisadas. Todas as populações, exceto uma do Texas geraram bandas ISSR específicas para as populações e os dados gerados mostraram que a população argentina se configura como uma espécie diferente. Os autores consideram que análises geradas pelo trabalho são fundamentais para um programa de controle biológico eficaz utilizando *G. ashmeadi*, por levar em consideração a análise da estrutura genética populacional de diferentes biótipos da espécie.

Ren *et al.* (2008) examinaram a estrutura genética populacional do pulgão chinês *Schlechtendalia chinensis* (Hemiptera; Aphididae) em relação à sua

exclusiva planta hospedeira, *Rhus chinensis*, em uma província montanhosa no oeste da China, usando marcadores ISSR. Neste estudo foi observado que as populações de pulgões apresentam estruturação genética semelhante às populações da planta hospedeira, porém as distâncias genéticas entre as populações de pulgões e da planta hospedeira não foram correlacionadas, fato atribuído principalmente à eventos como efeito fundador e deriva genética.

A estrutura genética de 13 populações do vetor *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae) da Índia, representativas de diferentes regiões geoclimáticas, foi analisada (Mendki *et al.*, 2011). Os autores demonstraram que as análises de agrupamento apontam para populações segregadas de acordo com sua respectiva condição geoclimática, sendo assim resultados úteis para a compreensão da variação populacional sob diferentes condições geográficas, podendo levar ao desenvolvimento de estratégias eficazes no manejo deste díptero vetor de doenças como filariose linfática, encefalite causada pelo vírus do Nilo Ocidental e encefalite japonesa.

Eyprepocnemis plorans (Orthoptera; Acrididae) é uma espécie de gafanhoto modelo para estudos de caracterização citogenética de cromossomo B. Por apresentar um polimorfismo bastante difundido para cromossomos supranumerário, a espécie vem sendo caracterizada geneticamente através de marcadores ISSR. Manrique-Poyato *et al.* (2013) analisaram a estrutura genética populacional em 10 populações naturais deste gafanhoto ao longo de duas regiões (sul e leste) da Península Ibérica. A análise dos marcadores revelou diferenciação genética significativa entre as populações do sul e leste, sendo observado um considerável isolamento por distância (IBD) entre elas. Os autores concluíram que elevado fluxo gênico contribuiu para a dispersão de cromossomos B em *E. plorans*.

Adicionalmente, Manrique-Poyato *et al.* (2015) verificaram através de marcadores ISSR, o fluxo de cromossomos B em populações ibéricas nesta mesma espécie. Os autores encontraram uma estruturação populacional significativa, no que diz respeito à populações portadoras e não-portadoras de cromossomo B, separadas por barreiras ao fluxo gênico.

Com relação à caracterização genética populacional em insetos de interesse econômico, Vijayan *et al.* (2006) estudaram seis populações de *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae), uma espécie de importância econômica conhecida como bicho-da-seda indiano, no intuito de auxiliar na conservação da espécie. Neste estudo foram usados 20 *primers* ISSR que produziram 87% de diversidade genética (índice Dg) entre as seis populações. Os resultados desse estudo mostraram correlação positiva entre as distâncias genética e geográfica das populações analisadas. Adicionalmente, o alto valor de *Gst* (0,657) entre as populações combinado ao baixo fluxo gênico indica diferenciação genética entre as populações de *S. c. ricini*. Baseados nestes dados, os autores sugeriram que as populações analisadas podem ser consideradas diferentes ecótipos e recomendam programas de conservação *in situ* para esta espécie.

Um outro exemplo envolvendo espécies de interesse econômico foi realizado com o bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera; Bombycidae) que é um inseto domesticado para a produção de seda onde a seleção artificial tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento (Pradeep *et al.*, 2005; Velu *et al.*, 2008). Marcadores ISSR foram utilizados por Velu *et al.* (2008) para determinar a relação genética entre estirpes mutantes de *B. mori* tendo como resultado, a formação de um grande *cluster* contendo seis *clusters* menores segregando as 20 linhagens mutantes do bicho-da-seda. Os autores concluíram o

marcador ISSR foi válido para determinação da variabilidade genética entre estirpes mutantes do bicho-da-seda e que pode ser uma ferramenta útil para a caracterização de um número maior de estirpes mantidas em centros de germoplasma.

A diversidade genética em 20 populações de *Kerria lacca* (Hemiptera; Tachardiidae), um inseto indiano produtor de resina com interesse industrial agregado, foi analisada utilizando marcadores ISSR (Saha *et al.*, 2011). Dezesete *primers* ISSR produziram 96,1% de polimorfismo genético e o dendrograma de agrupamento segregou as 20 populações em quatro grupos genéticos expressivos (*clusters*). Os resultados demonstraram uma variabilidade genética significativa nas populações, argumento que os autores consideram válido para programas de melhoramento genético de insetos produtores de resina.

Apis mellifera (Hymenoptera; Apidae) é um inseto social de considerável importância econômica e ecológica e tem sido analisado quanto à diversidade genética em distintas populações através da aplicação de marcadores ISSR. Desta forma, Al-Otaibi (2008) analisou a diversidade genética de 11 colônias que representam três raças de abelhas: tolerantes a ácaros, sensíveis a ácaros e moderadamente tolerantes. Os 10 *primers* ISSR utilizados geraram 34 fragmentos polimórficos e a heterozigosidade média para cada primer foi 0,244. Estes dados mostraram que a maior parte dos *loci* detectados foi polimórfica, refletindo o fato das 11 colônias do estudo serem originárias de uma ampla diversidade de raças, e demonstrando claramente que os marcadores ISSR são informativos para analisar a variabilidade genética entre e dentro das colônias de abelhas produtoras de mel.

Recentemente espécies-praga de insetos também vêm sendo alvo de estudos para caracterização da diversidade genética baseada em ISSR. Palma *et*

al. (2015) inferiram acerca da estrutura genética populacional de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera; Noctuidae), uma importante espécie-praga de lavouras de soja, com amostras das principais regiões produtoras de soja no Brasil. Os autores observaram que o baixo nível de polimorfismo nas populações, os altos níveis de fluxo gênico e a baixa estruturação genética são indicativos do intercâmbio gênico entre as diferentes regiões amostradas. Entretanto se constatou a presença de dois grupos gênicos distintos na amostragem e foi sugerido um manejo de controle de praga diferenciado para os dois grupos observados.

Em relação à ortópteros praga, a diversidade genética de 10 populações geograficamente distintas do gafanhoto *Oedaleus infernalis* (Acrididae) foi avaliada utilizando marcadores ISSR e sequências do gene *COI* (Citocromo Oxidase Subunidade I) por Sun *et al.* (2015). Um considerável nível de diversidade genética entre essas populações com base nos dois tipos de marcadores foi detectado, entretanto não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas sugerindo que a distribuição geográfica não é um fator limitante na conectividade genética entre populações de *O. infernalis*.

A fragmentação, perda de habitat e as modificações da paisagem são consideradas as principais causas da diminuição ou perda de biodiversidade (Foley *et al.*, 2005; Fischer e Lindenmayer, 2007; Swift e Hannon, 2010; Rösch *et al.*, 2013). Vandergast *et al.* (2009) analisaram a estrutura genética em populações do grilo-de-Jerusalém *Stenopelmatus n. sp.* "santa monica" das Montanhas de Santa Mônica e norte de Simi Hills (Los Angeles, Califórnia, EUA), para determinar os impactos da fragmentação ao longo dos últimos 70 anos com base em marcadores ISSR e sequências do gene *COI* (mtDNA). A diversidade genética baseada nos marcadores ISSR não estava correlacionada com o tamanho ou idade do

fragmento, diferentemente visto para mtDNA, onde a diversidade genética dentro dos fragmentos aumentou com o tamanho e diminuiu com a idade. Os resultados diferentes entre os marcadores podem ser devido à dispersão diferencial dos machos; aos diferentes tamanhos efetivos das populações; às taxas de triagem e / ou às taxas de mutação diferentes entre os marcadores utilizados. Entretanto a análise de ambos marcadores sugere que a conectividade genética entre as populações foi interrompida por rodovias e pelo desenvolvimento urbano, antes dos declínios nos tamanhos das populações amostradas. Os autores ressaltam que a conectividade genética pode ser perdida rapidamente em paisagens fragmentadas e artrópodes desprovidos da capacidade de voo podem servir como indicadores válidos para estes efeitos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar as relações cromossômico evolutivas em cinco espécies de gafanhotos neotropicais e a estruturação genética em populações da espécie *Ommexecha virens*.

3.2 Objetivos específicos

1. Mapear quatro genes de resposta à choque térmico e um de resposta imunológica em cromossomos meióticos das espécies *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris*, *Sthipra robusta* e *Schistocerca pallens*, e comparar os resultados com dados da literatura para sequências repetitivas, com a finalidade de subsidiar a elaboração de inferências cromossômico evolutivas;
2. Verificar a distribuição, prevalência e origem do cromossomo B da espécie *O. virens* oriunda de cinco populações distribuídas nos Estados de Pernambuco e Bahia;
3. Analisar a estrutura genética populacional em oito populações de *O. virens* distribuídas nos Estados de Pernambuco, Bahia e Ceará, e verificar se existe conectividade entre elas.

4. Capítulo I

Comparative analysis of chromosomal localization of single copy genes and repetitive sequences in five species of neotropical grasshoppers (Orthoptera: Acrodomorpha).

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Genetica* ('S-Gravenhage)

ISSN 0016-6707

Comparative analysis of the chromosomal localization of single copy genes and repetitive sequences in five species of neotropical grasshoppers (Orthoptera: Acrodomorpha).

Tyago Eufrásio de Souza^{1,2}; Diego Leandro de Oliveira¹; José Ferreira dos Santos¹; Tania Tassinari Rieger¹; Rita de Cássia de Moura²

¹Laboratório de Experimentação em *Drosophila*, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, PE

²Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, UPE, Recife, PE

Abstract The grasshoppers species *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris*, *Stiphra robusta* and *Schistocerca pallens* occur in northeast region of Brazil. This paper aims to compare single copy genes *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi*, and *Lys* mapping in neotropical grasshoppers *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris*, and *Stiphra robusta* performed by permanent *in situ* hybridization, and location of single copy genes sites with repetitive sequences located in cited species. Our results have shown a preferential location of these genes on L1 chromosomal pair (except to *Hsp70* and *Ubi*, located on L2 in most species) and have presented a variable position (pericentromeric, interstitial and distal). Secondary marks were visualized on medium chromosomes for majority of located genes. A considerable conservation was observed regarding chromosomal location of single copy genes, different from observed in repetitive sequences, which exhibited highly dynamic. This conservation is possibly due to the absence or low frequency of structural chromosomal rearrangements such as translocations and inversions. Regarding preferred gene location in pairs L1 and L2, it indicates that these chromosomes are carriers of the early gene locus, whereas they remains conserved in species from different families, being earliest *St. robusta* which belongs to Proscopiidae, considered basal family, originated approximately 183,82 millions of years ago.

Keywords Genome conservation; Heat shock proteins; Lysozyme; Orthoptera; Permanent *In Situ* Hybridization

Introduction

Grasshoppers have revealed high chromosomal macroconservation, showing conserved number (23 for males and 24 for females), acrocentric morphology, XO sex-chromosome system and presenting symmetrical karyotypes (Mesa et al. 1982; Bugrov, 1996; Pereira and Souza 2000; Souza et al. 2003; Loreto et al. 2005; Cabral-de-Mello and Martins 2010; Cabral-de-Mello et al. 2011a; Neto et al. 2013; Machado et al. 2014; Rocha et al. 2015). Besides, they present derived karyotypes on smaller scale (Moura et al. 1996; Souza and Moura 2000; Cabrero and Camacho 2008; Castillo et al. 2010; Cabral-de-Mello

et al. 2011a). This chromosomal pattern was observed in *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae) and *Schistocerca pallens* (Acrididae) by Mesa et al. (1982), and *Tropidacris collaris* (Romaleidae) by Rocha et al. (2015). Exceptions to this rule may be observed in *Ommexecha virens* (Ommexechidae), presenting one of the largest chromosomal pair (L1) submetacentric (Mesa and Ferreira 1977) and in *Stiphra robusta* (Proscopiidae), showing a lower diploid number $2n=19$ for males and 20 for females (Souza and Moura 1999).

Different from it was seen by classical cytogenetics, mapping of repetitive sequences have shown dynamism and microgenomic reorganization, involving distribution of repetitive sequences in grasshopper species (Cabrero et al. 2009; Cabral-de-Mello and Martins 2010; Cabral-de-Mello et al. 2011a; Neto et al. 2013; Machado et al. 2014; Rocha et al. 2015). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in grasshoppers has been applied to chromosome characterization by repetitive sequences mapping, thus allowing studies of chromosomal evolution and genome organization (Cabral-de-Mello and Martins 2010).

Regarding chromosomal location of repetitive sequences observed in Acrididae, Romaleidae, Ommexechidae and Proscopiidae families, which concentrates most of analyzed species, it is observed a more conserved chromosomal pattern for *H3/H4 histone* genes, where it can observe presence of an autosomal site only for most of 55 grasshopper species analyzed (Cabrero et al. 2009; Oliveira et al. 2011; Cabral-de-Mello et al. 2011b; Anjos et al. 2013; Bueno et al. 2013; Neto et al. 2013; Machado et al. 2014; Rocha et al. 2015; Silva-Neto et al. 2015; Souza et al. 2015). *U1 snDNA (U1)* was chromosomally located in 70 species of grasshoppers belonging to five families. Considerable conservation was observed, with most species bearing only one *U1* cluster, often located in third or fourth autosomal pairs. On the other hand, a remarkable dispersal was observed in Acrididae, in which it was observed one cluster on a single chromosomal pair to all chromosome pairs, and also occurrence of two or more clusters on the same chromosome (Anjos et al. 2015).

A wide variation of quantity and chromosomal location of repetitive sequences was noticed (Cabral-de-Mello and Martins 2010), with a more dispersed pattern observed in to *5S rDNA*, where the number of sites per species varied from a single chromosome pair to all chromosome pairs, with a range of intermediate situations, in 48 grasshopper species analyzed (Loreto et al. 2008; Cabral-de-Mello et al. 2011a; 2011b; Oliveira et al. 2011; Anjos et al. 2013; Bueno et al. 2013; Neto et al. 2013; Silva-Neto et al. 2015; Souza et al. 2015). Concerning *45S rDNA*, it was observed presence of one to eight chromosomal pairs carriers of *45S rDNA* sites (in autosomes, autosomes and X or in X) in 69 species of grasshoppers belonging to the Acrididae, Romaleidae, Ommexechidae and Proscopiidae,

including presence of *45S rDNA* in B chromosomes (Souza et al. 1998; Pereira and Souza 2000; Souza et al. 2003; Loreto et al. 2005; Cabrero e Camacho 2008; Cabral-de-Mello et al. 2011b; Carvalho et al. 2011; Oliveira et al. 2011; Anjos et al. 2013; Bueno et al. 2013; Neto et al. 2013; Rocha et al. 2015; Silva-Neto et al. 2015). On a smaller scale, microsatellite sequences in grasshopper *Abracris flavolineata* were also mapped (Milani and Cabral-de-Mello, 2014); telomeric repeats and pool of repetitive DNAs (*C₀t-1 DNA*) in six grasshoppers of Melanoplinae subfamily (Palacios-Gimenez et al. 2013) and intrachromosomal distribution of RTE retrotransposons in grasshopper *E. plorans* (Montiel et al. 2015).

Unlike repetitive sequences mapped by FISH on grasshoppers and other insects, location of single copy genes by permanent *in situ* hybridization (PISH) is scarce. Single copy gene mapping as *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27* related to heat shock proteins (HSPs) synthesis responds to elevated temperature and to a variety of chemical and physical stresses by a rapid increase in synthesis of a set of conserved polypeptides collectively (Zhao and Jones 2012). Ubiquitin (*Ubi*) demonstrates proteolytic function and participates in transcriptional activation processes, repair of DNA damage and signal process for endocytosis (Zhang and Matunis 2005). Lysozyme (*Lys*) is important to Orthoptera immunity because it lack antimicrobial peptides and strongly depends on the lysozyme activity for primary defense (Adamo 2004; 2010). Genes mentioned above were mapped from the 1990s in *Drosophila* species (Daffre et al. 1994; Izquierdo 1994; Drosopoulou et al. 1996; Timakov et al. 2002; Evgen'ev et al. 2004), and *Hsp83*, *Hsp70* and *Ubi* genes were also mapped in drosophilid *Zaprionus indianus* (Campos et al. 2007).

In 2000s, Rieger et al. (2007) and Souza et al. (2014) mapped some single copy genes on grasshopper species. *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27* and *Ubi* genes were mapped in *S. pallens* (Rieger et al. 2007) and the *Period* gene (*Per*), an important gene of circadian cycle, which was located in *O. virens*, *X. d. angulatus*, *T. collaris*, *St. robusta* and *S. pallens* by Souza et al. (2014). In both studies, it was observed a prevalence of these genes located in L1 autosomal pair, less frequently occurring in L2 and M7 pairs.

In order to deepen the knowledge of chromosomal evolution in neotropical grasshoppers species *O. virens*, *X. d. angulatus*, *T. collaris*, *St. robusta* and *S. pallens*, chromosomal locations of *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi* and *Lys* genes were mapped in meiotic chromosomes and obtained result were compared with location of repetitive copy genes, specifically *45S rDNA*, *5S rDNA*, *H3/H4 histone* and *U1 snDNA*.

Materials and Methods

Specimens and cytological preparations

Grasshoppers species analyzed, number of captured specimens and geographical coordinates of sampling points are presented on Table 1. All samples were registered and preserved at Departamento de Genética (Centro de Biociências, UFPE, Recife, Brazil); insect collection and all institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. After the capture, specimens were dissected and the tests were fixed in Carnoy and stored in freezer. Slides were prepared by the classical squash technique, with a testicular follicle in 45 % acetic acid. After freezing in liquid nitrogen to remove the cover slip, all preparations were stored at 4 °C until hybridization. Best preparations were used for permanent *in situ* hybridization (PISH), and a minimum of 105 cells nuclei and three representatives of each species were used.

Plasmid amplification and probe preparations

Probes were prepared from conserved sequences of *Drosophila melanogaster* genes *Hsp70* (Livak et al. 1978), *Hsp83* (Holmgren et al. 1981), *Hsp27* (Corces et al. 1980), and *Ubi* (Izquierdo et al. 1994), all cloned in pBR322-derived plasmids. YIprd2-Lys plasmid, containing complete lysozyme human gene, was also used as a probe. Plasmids were transformed into DH5 α strain of *Escherichia coli* with the calcium chloride method and were extracted by alkaline lysis (Ausubelet *al.* 2002). Whole plasmids were biotin labeled by nick translation using BioNick DNA system, as indicated by manufacturer (Gibco/BRL, Paisley, Scotland), to be used as probes.

Permanent *in situ* hybridization (PISH) procedures

Permanent *in situ* hybridization procedures were performed as described for the first time for grasshoppers by Rieger et al. (2007). Briefly, hybridizations were carried out at 37 °C in 30 % formamide for 36 hour, using 200 ng biotin-labeled probe for each slide. Washes were made at 25 °C with 2 X SSC, adopting stringency level of 65 % (Schwarzacher and Heslop-Harrison 2000). Streptoavidin-alkaline phosphatase conjugate (SAP), nitrobluetetrazolium (NBT), and bromo-cloro-indolil-phosphate (BCIP) were used for detection of hybridization sites by visualization of dark blue spots over the chromosomes. After hybridization, chromosome preparations were counterstained with lactic orcein (1 % orcein in 20 % lactic acid and 45 % acetic acid) diluted 1:10 in 45 % acetic acid, air dried

and mounted in Entellan® (Merck). PISH signals were analyzed and documented under phase-contrast microscopy Leica® WILD MPS 52 and edited using Adobe Photoshop CS3 Extended software. Since heterologous probes were used, signals were quantified as described previously by Rieger et al. (2007) establishing a minimum of 30 % signals at a chromosome site as the criterion of consistent gene localization.

Results

Hybridization marks in these species are shown in Figure 1, where preferential localization in L1 autosomal pair can be observed, except for *Hsp70* gene, which was found in L2 autosomal pair. *Ubi* gene was located in L1 or L2 autosomal pairs. In some cases, second copy was observed in M3, M4, M5 or M8 autosomal pairs.

Hsp83 gene was located in interstitial region on L1 chromosome pair in *O. virens* (Fig. 1a) and pericentromeric region in this same pair of *X. d. angulatus* (Fig. 1b), and *T. collaris* (Fig.1c), and it was observed in distal region of L1 pair in *St. robusta* (Fig. 1d). *Hsp70* gene was located on L2 chromosome and in addition it was observed secondary copies of this gene in the medium chromosome pairs in all species studied here (Figure 1a, b, c and d). *Hsp27* gene presented site in the distal region of L1 pair on *X. d. angulatus*, *T. collaris* and *St. robusta* (Fig. 1b, c and d) and pericentromeric region of L1 pair in *O. virens* (Fig. 1a). It was not observed *Hsp27* sites in medium chromosomes.

Ubi gene presented sites in two autosomal types on the species analyzed here: L1 pair for *T. collaris* and *St. robusta* (Fig. 1c and d) and L2 pair for *O. virens* and *X. d. angulatus* (Fig. 1a and b); additional copies of this gene were observed in medium chromosome of all species analyzed. *Lys* gene was mapped on different portions of the L1 chromosome for all species studied (Fig. 1a, b, c, d and e). Additional *Lys* copies were observed in medium chromosome of *O. virens*, *X. d. angulatus* and *T. collaris*.

Chromosomal location and position (pericentromeric, interstitial and distal) of the genes described above is in Table 2. Efficiency of *in situ* hybridization obtained for the studied species ranged from 33% to 94% of signal marked nuclei (Supplementary table).

Discussion

Results of single copy genes mapping in five species analyzed here showed conservation as the preferred location on L1 chromosome. Souza et al. (2014) observed the same for *Period* gene mapped for these species. However, for *Hsp70* gene it was observed

gene location in L2 pair on all species observed in this study. This chromosomal conservation localization is due to absence or low frequency of structural chromosome rearrangements, such as translocations and inversions, and to formation of synteny blocks on chromosomal regions where these genes occur (John and Hewitt 1969; Schubert 2007; Colombo 2013). If the locations of single copy genes take place in pericentromeric regions, this conservation is possibly due to presence of heterochromatin blocks in these regions, since default location of these blocks in mentioned species is predominantly pericentromeric (Souza et al. 1998; Souza and Moura 1999; Souza and Melo 2007; Carvalho et al. 2011; Rocha et al. 2015).

When chromosomal location of repetitive sequences is observed in chromosomal pairs on species analyzed, we observed presence of sites in L1 and L2 pairs, as seen in *S. pallens* presented *snDNA U1* sites in L1 pair and L2 (Anjos et al. 2015); in *O. virens* sites of *U1* in L1 pair and *45S rDNA* in L2 pair (Anjos et al. 2015; Carvalho et al. 2011); and in *X. d. angulatus* presents *H4 histone* sites in L2 pair (Machado et al. 2014). In *T. collaris* e *St. robusta* species, repetitive DNA sites are not located in L1 and L2 pairs, but in medium or small chromosomal pairs (Cabral-de-Mello et al. 2011b; Anjos et al. 2015; Rocha et al. 2015). Preferred location is also observed for other repetitive sequences mapped in the other three species analyzed in this work (Table 3).

Chromosomal location of single copy genes mapped in Rieger et al. (2007), Souza et al. (2014) and this work, showed a preferred location in the L1 and L2 chromosomal pairs. These locations are possibly linked to the early genic locus (L1 and L2 pairs), present in all species, although belonging to different families. Species analyzed in this study belong to the superfamilies group Acridomorpha, which corresponds to a monophyletic group (Song 2010; Song et al. 2015) whose superfamily Proscopioidea (Proscopiidae) are considered basal and originated in the Lower Jurassic (183,82 Mya, approximately) and Acridoidea (Acrididae, Romaleidae and Ommexechidae), considered modern and diverse, originated in the Early Cretaceous (124,41 Mya, approximately) (Song et al. 2015). Superfamilies origin supports the proposed for single copy genes, but not for the repetitive sequences chromosomal location, except for *H3 histone* and *U1 snDNA* mapping, that showed a degree of conservation (Cabrero et al. 2009; Anjos et al. 2015) and present on the fourth pair in the four Proscopiidae species currently analyzed (Cabral-de-Mello et al. 2011b).

Generally, all single copy genes mapped on species examined showed secondary copies in the medium sized pairs. This indicates possibility of duplication occurrence during chromosomal microevolution on representatives of different grasshopper families. In

Drosophila species, which were observed more than one copy of *Hsp70* gene (Segarra et al. 1996), it was suggested gene duplication events then translocation / inversion for *Drosophila* development. A similar result were observed in *Ubi* gene, except for *S. pallens*. The presence of more than one copy of *Ubi* gene was observed for *D. melanogaster* (Izquierdo 1994); *D. repleta* and *D. buzzati* (Ranz et al. 1997). *Ubi* gene shows marking in L1 for *T. collaris* and *St. robusta*; and in L2 for *O. virens*, *X. d. angulatus* and *S. pallens*. Although most genes have presented secondary copies, *Lys* and *Hsp70* genes showed considerable conservation, presenting sites located on L1 and L2 chromosomal pairs of all species analyzed, respectively. Chromosomal location of *Hsp27* gene is an exception, secondary copies in species analyzed in this study were not observed. However, it is seen a considerable conservation with respect to the *Hsp27*, located on L1 chromosomal pair of all species analyzed. *Hsp83* gene is not duplicated in *Drosophila* (Holmgren et al. 1981; Blackman and Meselson 1986; Konstantopoulou and Scouras 1998) and in other insects (Landais et al. 2001). However, it was seen secondary copies in the medium pairs of *O. virens* and *T. collaris*. This *Hsp83* second signal probably represents partial homology to an unknown gene, also seen in *Zaprionus indianus* (Campos et al. 2007).

Concerning chromosomal position of single copy genes cited herein, 21 sites (55,26%) occur in interstitial region, whereas nine sites (23,68%) were distal, and eight sites (21,05%) were pericentromeric. This preferred location in the interstitial region is similar to *H3 / H4 histone* genes, where out of 35 Acrididae species analyzed, 88,57% showed sites in interstitial region for the gene in question (Cabrero et al. 2009). In contrast to rDNA, the *H3 / H4 histone* gene cluster exhibits a high conservation with regard to chromosomal location, presenting site in only one autosomal pair (Cabrero et al. 2009; Cabral-de-Mello et al. 2011b; Anjos et al. 2013; Neto et al. 2013; Silva-Neto et al. 2015), similar to single copy genes location in this work.

Mapping single-copy gene and a compilation of mapping data of repetitive sequences indicated conservation of localization of single copy genes sites in *O. virens*, *X. d. angulatus*, *T. collaris*, *St. robusta* and *S. pallens* species, different from repetitive sequences, which exhibit a genomic dynamic probably due to transposition. Other studies mapping of unique sequences in species from other families of acridomorphs is necessary to verify conservation of the observed location pattern.

Acknowledgements

The authors would like to thank Nathaly Ramos for English revisions and Vilma Loreto for suggestions to the manuscript; Edital Reuni-UFPE No. 01/2012 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships awarded to T.E. Souza and scholarship of R.C. Moura (PQ-2, processo 305298/2014-3).

References

- Adamo SA (2004) Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology*, 50:209 – 216
- Adamo, SA (2010) Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity*, 24:194 - 200
- Anjos A, Loreto V, Souza MJ (2013) Chromosome mapping of ribosomal genes and histone H4 in the genus *Radacridium* (Romaleidae). *Genetics and molecular biology* 36(3):336-340
- Anjos A, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JPM, Loreto V, Cabrero J, Souza MJ, Cabral-de-Mello DC (2015) U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. *Heredity* 114(2):207-219
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, et al. (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. Inc., Hoboken
- Blackman RK and Meselson M (1986) Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* hsp82 gene. *J Mol Biol* 188:499-515
- Bugrov AG (1996) Karyotypes of the short-horned Orthopteran insects (Orthoptera, Caelifera). from Russia, Kazakhstan, Central Asia and the Caucasus. *Folia Biol* 44:15-25
- Cabral-de-Mello DC, Martins C (2010) Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as models. *Microscopy: Science, technology, applications and education* 1: 658-669
- Cabral-de-Mello DC, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM (2011a) Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica* 139:921–931
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011b) 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* 132:89–93
- Cabrero J, Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research* 16:595–607

- Cabrero J, Bugrov A, Warchałowska-Śliwa E, López-León MD, Perfectti F, Camacho JPM (2003) Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. *Heredity* 90:377–381
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Research* 17(3):397–404
- Campos SRC, Rieger TT, Santos JF (2007) Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *insitu* hybridization in *Zaprionus indianus*. *Genetics and Molecular Research* 6(2):262–276
- Castillo ER, Marti DA, Bidau CJ (2010) Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. *Journal of Orthoptera Research* 19(2):213–231
- Carvalho DB, Rocha MF, Loreto V, Silva AEB, Souza MJ (2011) *Ommexecha virens* (Thunberg, 1824) and *Descampsacris serrulatum* (Serville, 1831) (Orthoptera, Ommexechidae): karyotypes, constitutive heterochromatin and nucleolar organizing regions. *Comp Cytogen* 5(2):123–132
- Colombo PC (2013) Micro-evolution in grasshoppers mediated by polymorphic Robertsonian translocations. *Journal of Insect Science* 13(1):43
- Daffre S, Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics* 242(2):152–162
- Drosopoulou E, Konstantopoulou I, Scouras ZG (1996) The heat shock genes in the *Drosophila montion* subgroup: chromosomal localization and evolutionary implications. *Chromosoma* 105:104–110
- Evgen'ev MB, Zatssepina OG, Garbuz D, Lernman DN, Velikodvorskaya V, Zelentsova E, Feder ME (2004) Evolution and arrangement of the hsp70 gene cluster in two closely related species of virilis group of *Drosophila*. *Chromosoma* 113:223–232
- Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R, et al. (1981) Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3775 – 3778
- Izquierdo M (1994) Ubiquitin genes and ubiquitin protein location in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma* 103:193–197
- John B, Hewitt GI (1968) Patterns and pathways of chromosome evolution within the Orthoptera. *Chromosoma* 25(1):40–74
- Konstantopoulou I, Scouras ZG (1998) The heat-shock gene hsp83 of *Drosophila auraria*: genomic organization, nucleotide sequence, and long antiparallel coupled ORFs (LAC ORFs). *J Mol Evol* 46:334–343

- Landais I, Pommet J, Mita K, Nohata J, et al. (2001) Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyxmori* and *Spodopterafrugiperda*. *Gene* 271:223-231
- Livak KJ, Freund R, Shweber M, Wensink PC (1978) Meselson, M. Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 11:5613-5617
- Loreto V, Cabrero J López-León MD, Camacho JPM, Souza MJ (2008) Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research* 16:233–241
- Loreto V, Stadtler E, de Melo NF, Souza MJ (2005) A comparative cytogenetic analysis between the grasshopper species *Chromacris nuptialis* and *C. speciosa* (Romaleidae): constitutive heterochromatin variability and rDNA sites. *Genetica* 125(2-3):253-260
- Machado CB, Silva-Neto LC, Loreto V, Souza MJ (2014) B chromosome prevalence and physical mapping of 18S rDNA and H4 histone sites in the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae). *Genetics and Molecular Research* 13(3):7052-7060
- Mesa A, Ferreira A, Carbonell CS (1982) Cariologia de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. *Ann Soc Ent Fr* 18:507-526
- Mesa A, Ferreira A (1977) Cytological studies in the family Ommexechidae (Orthoptera: Acridoidea). *Acrida* 6:261-271
- 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
- Montiel EE, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, Marchal JA, Sánchez A, Perfectti F, López-León MD, Camacho JPM (2015) Intragenomic distribution of RTE retroelements suggests intrachromosomal movement. *Chromosome Research* 23(2):211-223
- Moura RC, Souza MJ, Tashiro T (1996) Cytogenetics characterization of the genera *Scleratoscopia* and *Tetanorhyncus* (Orthoptera, Proscopiidae). *Cytologia* 61:169–178
- Neto MS, Souza MJ, Loreto V (2013) Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *MolecularCytogenetics* 6:41. doi: 10.1186/1755-8166-6-41
- Palacios-Gimenez OM, Castillo ER, Martí DA, Cabral-de-Mello DC (2013) Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMCEvolutionary Biology* 13:167
- Ranz JM, Segarra C, Ruiz A (1997). Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* 145: 281-295

- Rieger TT, Oliveira-Silva SV, Pacheco IA, Chagas BS, Santos JF (2007) Localization of *HSP* single-copy genes by inexpensive, permanent non-fluorescent *in situ* hybridization on meiotic chromosomes of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Acrididae). *Genetics and Molecular Research* 6(3):643-649
- Rocha MF, Pine MB, Oliveira EFAS, Loreto V, Gallo RB, Silva CRM, Domenico FC, Rosa R (2015) Spreading of heterochromatin and karyotype differentiation in two *Tropidacris* Scudder, 1869 species (Orthoptera, Romaleidae). *Comp Cytogen* 9(3):435-450
- Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Current opinion in plant biology* 10(2):109-115
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2000) Practical *In Situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Segarra C, Ribó G, Aguadé M (1996) Differentiation of Muller's chromosomal elements D and E in the *obscura* group of *Drosophila*. *Genetics* 144: 139-146
- Silva-Neto LC, Bernardino AC, Loreto V and Moura RC (2015) Physical mapping of 18S and 5S rDNA loci and histone H3 gene in grasshopper species of the subfamily Gomphocerinae (Acrididae). *Genetics and molecular research* 14(4):15008-15015
- Song H (2010) Grasshopper systematics: past, present and future. *J Orthoptera Res* 19:57-68
- Song H, Amédégnato C, Cigliano MM, Desutter-Grandcolas L, Heads SW, Huang Y, Otte D, Whiting MF (2015) 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics* 31:621-651
- Souza MJ, Haver PR, Melo NF (2003) Karyotype, C and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae). *Caryologia* 56(3):261-267
- Souza MJ, Melo NF (2007) Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera; Acrididae; Cyrtacanthacridinae): Karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region (NORs). *Genetics and Molecular Biology* 30(1):54-59
- Souza MJ, Moura RC (1999) Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera, Proscopiidae). *Cytobios* 101:137-144
- Souza MJ, Pereira LG (2000) Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae; Orthoptera). *Cytobios* 103:111-119
- Souza MJ, Rufas JS, Orellana J (1998) Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Orthoptera; Romaleidae). *Caryologia* 51:73-80
- Souza TE, Oliveira DL, Santos JF, Rieger TT (2014) Physical mapping of the *Period* gene on meiotic chromosomes of South American grasshoppers (Acridomorpha, Orthoptera). *Genetics and Molecular Research* 13(4):10829-10836

Souza TE, Silva-Neto LC, Santos JF, Loreto V, Rieger TT (2015) Short Communication A small B chromosome in the grasshopper *Ommexecha virens* (Ommexechidae). Genetics and molecular research 14(4):17505-17510

Timakov B, Liu X, Turgut I, Zhang P (2002) Timing and targeting of P-element local transposition in the male germ line cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics 160:1011–1022

Zhang XD, Matunis MJ (2005) Ubi in charge: Regulating E2 enzyme nuclear import. Nature Cell Biology 7(1):12-14

Zhao L, Jones WA (2012) Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. ISJ9:9-101

List of Tables

Table 1 Number of grasshoppers males specimens analyzed and geographical coordinates of collection places in the states of Pernambuco (PE), Piauí (PI), Paraíba (PB) and Bahia (BA) in the Northeastern region of Brazil.

Species	Number of analyzed specimens	Collection places	Coordinates	
<i>Ommexecha virens</i>	02	Sobradinho, BA	09°26'15"S	40°48'45" W
	03	Mucugê, BA	13°03'45"S	41°18'45" W
<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	02	Marcolândia, PI	07°26'15"S	40°41'15" W
	01	Exu, PE	07°30'50"S	39°42'33" W
<i>Tropidacris collaris</i>	03	Recife, PE	08°01'05" S	34°56'48" W
	01	Andaraí, BA	12°48'45" S	41°18'45" W
<i>Schistocerca pallens</i>	04	Itamaracá, PE	07°41'15" S	34°48'45" W
<i>Stiphra robusta</i>	07	Fagundes, PB	07°21'18" S	35°46'30" W

Table 2 Chromosomal location of the conserved genes Heat shock response (*Hsps*), Ubiquitin (*Ubi*) and Lysozyme (*Lys*) in five species of neotropical grasshoppers (Acridiomorpha). The *Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi* location for *S. pallens* was extracted from Rieger et al. (2007). *Maker in medium pair only.

Gene	Specie	Location and position in large chromosome	Location and position in medium chromosome
Hsp83	<i>Ommexecha virens</i>	L1- Interstitial	M4- Interstitial
	<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	L1- Pericentromeric	
	<i>Tropidacris collaris</i>	L1- Pericentromeric	M3- Interstitial
	<i>Stiphra robusta</i>	L1- Distal	
	<i>Schistocerca pallens</i>		M7*- Interstitial
Hsp70	<i>Ommexecha virens</i>	L2- Pericentromeric	M4- Pericentromeric
	<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	L2- Interstitial	M8- Interstitial
	<i>Tropidacris collaris</i>	L2- Interstitial	M4- Pericentromeric
	<i>Stiphra robusta</i>	L2- Pericentromeric	M5- Interstitial
	<i>Schistocerca pallens</i>	L2- Interstitial	
Hsp27	<i>Ommexecha virens</i>	L1-Interstitial	
	<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	L1- Distal	
	<i>Tropidacris collaris</i>	L1- Distal	
	<i>Stiphra robusta</i>	L1- Distal	
	<i>Schistocerca pallens</i>	L1- Interstitial	
Ubi	<i>Ommexecha virens</i>	L2- Interstitial	M4- Interstitial
	<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	L2- Interstitial	M4- Interstitial
	<i>Tropidacris collaris</i>	L1- Distal	M3- Interstitial
	<i>Stiphra robusta</i>	L1- Interstitial	M5- Interstitial
	<i>Schistocerca pallens</i>	L2- Interstitial	
Lys	<i>Ommexecha virens</i>	L1- Distal	M4- Interstitial
	<i>Xyleus discoideus angulatus</i>	L1- Pericentromeric	M4- Distal
	<i>Tropidacris collaris</i>	L1- Pericentromeric	M4- Interstitial
	<i>Stiphra robusta</i>	L1- Distal	
	<i>Schistocerca pallens</i>	L1- Distal	

Table 3 Chromosomal location of the single copy genes (*Hsp83*, *Hsp70*, *Hsp27*, *Ubi*, *Lys* and *Period* [*Per*]) and repetitive copy (45S *rDNA* [45S], 5S *rDNA* [5S], *H3* or *H4 histone* [*H3* or *H4*] and *U1 snDNA* [*U1*]) in five species of Neotropical grasshoppers.

[illegible]

Supplementary table Quantification of *in situ* hybridization signals for *Heat-shock proteins* (*Hsp83*, *Hsp70* and *Hsp27*), *Ubiquitin* (*Ubi*) and *Lysozyme* (*Lys*) genes on meiotic chromosomes of grasshoppers species utilized. Featured marks higher than 30%.

Specie	Gene	Total of analyzed nuclei	% of marked nuclei	% of marked chromosomes											
				L1	L2	L3	M4	M5	M6	M7	M8	S9	S10	S11	X
<i>Ommexecha virens</i>	<i>Hsp83</i>	115	67	77	12	-	58	-	-	-	-	10	-	-	9
	<i>Hsp70</i>	172	58	18	75	-	63	-	-	-	-	-	4	-	6
	<i>Hsp27</i>	135	65	77	15	-	-	10	-	-	-	15	-	-	7
	<i>Ubi</i>	123	63	19	77	-	58	-	-	-	-	15	-	-	7
	<i>Lys</i>	106	51	78	12	-	59	20	-	-	-	-	18	-	6
<i>Xyleus discoideus angulatus</i>				L1	L2	L3	M4	M5	M6	M7	M8	S9	S10	S11	X
	<i>Hsp83</i>	266	48	65	8	11	5	-	-	5	-	-	-	-	6
	<i>Hsp70</i>	101	77	-	74	-	-	-	-	-	-	-	17	-	12
	<i>Hsp27</i>	243	47	51	23	-	-	-	12	-	-	-	-	-	4
	<i>Ubi</i>	154	52	9	50	-	62	-	-	16	-	2	-	-	-
	<i>Lys</i>	111	73	69	15	4	54	-	-	-	11	10	-	-	7
<i>Tropidacris collaris</i>				L1	L2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	S9	S10	S11	X
	<i>Hsp83</i>	117	62	63	16	62	-	-	-	-	-	-	12	-	20
	<i>Hsp70</i>	166	61	21	66	8	44	13	-	8	-	3	-	-	4
	<i>Hsp27</i>	161	38	80	7	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ubi</i>	120	54	33	8	42	-	-	15	-	-	-	-	-	2
	<i>Lys</i>	105	71	83	24	-	69	14	-	13	-	-	-	-	-
<i>Stiphra robusta</i>				L1	L2	L3	L4	M5	M6	M7	M8	M9	X		
	<i>Hsp83</i>	163	59	61	11	6	-	7	3	-	-	-	5		
	<i>Hsp70</i>	128	57	11	44	16	-	33	-	-	9	5	14		
	<i>Hsp27</i>	170	50	53	20	12	-	-	-	-	-	-	8		
	<i>Ubi</i>	131	56	47	15	2	-	38	8	7	-	-	-		
	<i>Lys</i>	97	55	85	-	18	-	-	5	-	-	7	9		
<i>Schistocerca pallens</i>				L1	L2	L3	M4	M5	M6	M7	M8	S9	S10	S11	X
	<i>Lys</i>	110	71	94	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-

List of Figures

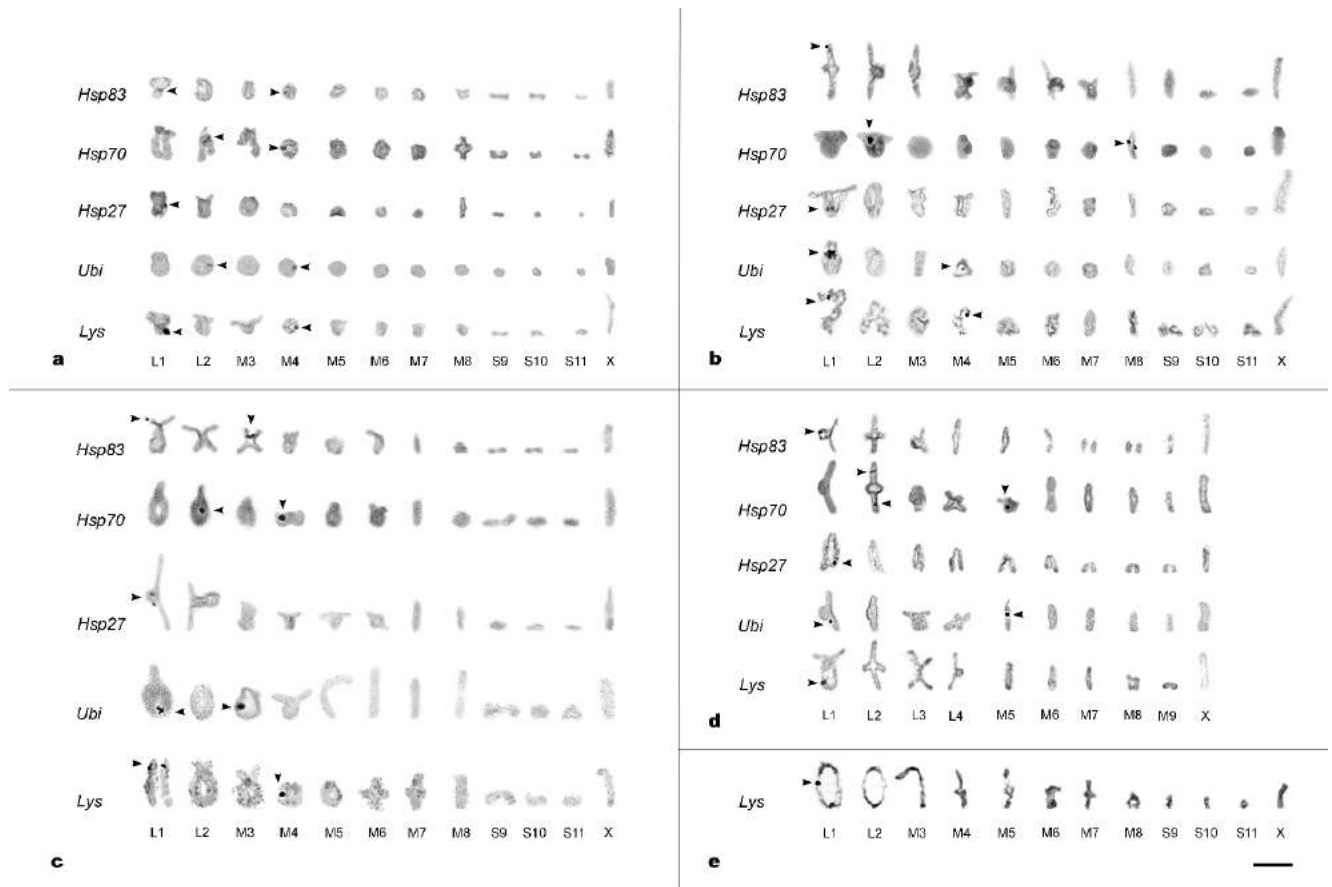


Fig. 1 Cariogram based on meiotic cells (diplotene and metaphase I) presenting the location of single copy genes (arrowheads) on chromosome complement of grasshoppers species used in this study. (a) *Ommexecha virens*; (b) *Xyleus discoideus angulatus*; (c) *Tropidacris collaris*; (d) *Stiphra robusta*; (e) *Schistocerca pallens*. Bar = 10 µm.

5. Capítulo II

A small B chromosome in the grasshopper *Ommexecha virens* (Ommexechidae)

Manuscrito publicado no periódico *Genetics and Molecular Research*

ISSN 1676-5680



Short Communication

A small B chromosome in the grasshopper *Ommexecha virens* (Ommexechidae)

T.E. Souza¹, L.C. Silva-Neto², J.F. Santos¹, V. Loreto² and T.T. Rieger¹

¹Laboratório de Experimentação em *Drosophila*, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Genética e Citogenética Animal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: T.E. Souza

E-mail: tyago_eufrazio@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 14 (4): 17505-17510 (2015)

Received July 24, 2015

Accepted October 8, 2015

Published December 21, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.21.22>

ABSTRACT. B chromosomes, also called supernumerary or accessory chromosomes, have been characterized as extra elements found in the karyotypes of different eukaryotic species. B chromosomes are nonvital and only occur in some individuals within a species. Moreover, the chromosomes contain silenced genes, and they exhibit heterochromatinization and the accumulation of repetitive DNA and transposons. In the present study, we describe an extra chromosome in the grasshopper *Ommexecha virens* for the first time, using conventional staining and fluorescent *in situ* hybridization techniques, and we discuss the possible origin of the B chromosome.

Key words: B chromosome; Fluorescent *in situ* hybridization; Grasshopper; Ommexechidae

INTRODUCTION

Supernumerary chromosomes (B chromosomes) are extra elements, not homologous to the standard complement and present in several species of plants and animals. In insects, occur mainly in Diptera, Coleoptera and Orthoptera (Loreto et al., 2008). They may have different origins, including the derivation of autosomal (Jamilena et al., 1995), sexual chromosomes (Lopez-Leon et al., 1994) and resulting from interspecies crosses (McAllister and Werren, 1997). The molecular mechanisms that drive the evolution of these segments resemble that of univalent sex chromosomes, as gene silencing and heterochromatinization processes (Camacho et al., 2000). B chromosomes are nonvital and only occur in some individuals within a species. Furthermore, they typically have accumulation mechanisms that increase their transmission prior to, during, or following gametogenesis (Nur, 1977). They are often heterochromatic, and do not pair and recombine with any of the A chromosomes during meiosis. Moreover, the chromosomes usually do not contain major genes, with the exception of ribosomal DNA (rDNA) sequences, which have been mapped on many plant and animal B chromosomes (Jones, 1995). About the grasshoppers species that present B chromosome, *Eyprepocnemis plorans* is among the most studied. This species has forty types of B variants along the populations found in the Mediterranean and Atlantic coasts of the Iberian Peninsula and North Africa (Cabrero et al., 1999). Loreto et al. (2008) investigated the possible origin of macro B chromosome in *Rhammatocerus brasiliensis* and *Xyleus discoideus angulatus* populations originated in Northeastern region of Brazil. In these species, the B chromosome proved very similar to the X chromosome in morphology. However, the FISH results show an autosomal origin of these chromosomes.

The *Ommexecha* genus presents the major geographical distribution among Ommexechidae, which is found from East of the Andes to the Caribbean and Northeastern Brazil. Of the six known species, only *O. virens* presents great phenotypic (morphologic and chromatic) variability (Mesa and Ferreira, 1977). The *O. virens* karyotype was characterized using conventional staining, C-banding, silver nitrate impregnation, base specific fluorochromes and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with 18S rDNA probe (Carvalho et al., 2011). A total of $2n = 23$ chromosomes were found in this species, which exhibited predominantly acrocentric morphology, with the exception of submetacentric L1 and the X0:XX sexual mechanism. The karyotype is generally arranged as three pairs of large chromosomes (L1 to L3), five pairs of medium chromosomes (M4 to M8), three pairs of small chromosomes (S9 to S11), and an X chromosome (considered medium-sized). In this study, we present the first description of an extra chromosome in an Ommexechidae representative, and discuss the possible origin of the B chromosome in *O. virens*.

MATERIAL AND METHODS

A total of 115 *O. virens* individuals, collected in Pernambuco (PE) and Bahia (BA) states in Northeast Brazil (Table 1), were analyzed. The testes and ovaries were fixed in Carnoy's solution (3:1 ratio of ethanol and acetic acid), and the cytological preparations were obtained via the squashing follicles technique. For conventional analysis, the slides were stained with 1% lacto-acetic orcein. CMA₃/DA/DAPI staining was accomplished following the methods specified by Schweizer et al. (1983). DNA extractions for fluorescent *in situ* hybridization (FISH) preparations were performed following the methods specified by Walsh et al. (1991). Approximately 1 to 2 testicular follicles were homogenized in 10% Chelex, and were subsequently subjected to 56° and 96°C water baths.

The material was then centrifuged at 13,000 rpm, and the supernatant was stored at -20°C prior to polymerase chain reaction (PCR) analysis. The 5S rDNA, 18S rDNA, and H3 histone gene probes were obtained using PCR. To amplify the genes of interest, we used the following primers: 5'-AACGACCATACCACGCTGAA-3' and 5'-AAGCGGTCCCCCATCTAAGT-3' for the 5S rDNA gene; 5'-CCCCGTAATCGGAATGAGTA-3' and 5'-GAGGTTTCCCGTGTGAGTC-3' for the 18S rDNA gene; 5'-ATATCCTTRGGCATRATRGAGTAC-3' and 5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3' for the H3 histone gene. The FISH analysis was done according to the methods of Moscone et al. (1996); using the 18S and 5S rDNA and H3 histone probes. A stringency level of 72% was determined after three washes in 2X SSC at 42°C, two washes in 0.1X SSC at 42°C, and one wash in 2X SSC at 25°C (5 min each). The FISH and fluorochrome procedures were conducted using materials from two specimens with B chromosomes (1B) and two specimens without B chromosomes (0B). Photographs were obtained by Leica CW4000 FISH capture system coupled to a Leica DMLB fluorescent microscope. The figures were mounted with the use of the Adobe Photoshop CS5 Extended software.

RESULTS AND DISCUSSION

The karyotypes of analyzed *O. virens* populations were described by Carvalho et al. (2011), but the presence of B chromosomes in the Sobradinho (BA) population was not included (Table 1). In this population, a small B chromosome, which was similar to the S9 pair both in size and acrocentric morphology, was visualized in 16% of the individuals studied. In other grasshopper populations, such as *Melanoplus femur-rubrum* (Nur, 1977), *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil et al., 1984), and *Rhammatocerus brasiliensis* (Loreto et al., 2008), B chromosome prevalence was similar (10%, 10 to 15%, and 6.5 to 17.9%, respectively). In populations where the B chromosome recently emerged, the frequency was usually high (>25%) (Araújo et al., 2001). On the other hand, in the case of B chromosome stability or extinction, this number was relatively low (Riera et al., 2004). The 16% frequency in the Sobradinho population may be an indication that the origin of this B chromosome is not recent.

The small B chromosome of *O. virens* exhibits picnosis similar to that of the chromosomal complement pairs, with the exception of X (Figure 1a). The other analyzed populations did not exhibit B chromosomes (Table 1).

Table 1. Localities of collections with geographical coordinates in the States of Pernambuco (PE) and Bahia (BA) in the Northeastern region of Brazil, and the number of individuals analyzed and 1B individuals of *Ommexecha virens* populations studied.

Localities	Coordinates	Number of individuals analyzed	Number of 1B individuals
Sobradinho - BA	9°27'19"S; 40°49'24"W	25	4
Bulque - PE	8°37'23"S; 37°9'12"W	24	0
Rio de Contas - BA	13°34'44"S; 41°48'41"W	21	0
Andaraí - BA	12°48'26"S; 41°19'53"W	23	0
Mucugê - BA	13°0'19"S; 41°22'45"W	22	0

The 5S rDNA sites were preferentially present in the pericentromeric/proximal region of the four largest autosomal pairs (L1, L2, L3, and M4). However, a 5S rDNA site was also identified in the L3 terminal region. In L2, the 5S rDNA site collocated with the 18S rDNA site. The 1B individuals did not have the 5S rDNA site in the extra chromosome, and the 5S rDNA localization

pattern was the same as that in 0B individuals. The results indicated variation in the number of 5S rDNA sites in both individuals (Figure 1b, c), and this was observed in other grasshopper species both with and without B chromosomes (Cabral-de-Mello et al., 2011). The *O. virens* 18S rDNA analysis was previously performed by Carvalho et al. (2011) in 0B individuals, and it was conducted in the present study to compare the possible 18S sites in 1B individuals. The 18S rDNA sites were observed in the pericentromeric/proximal regions of the L2, S9, and S10 chromosomes (Figure 1b, c), and the pattern of 18S rDNA sites was the same in 0B and 1B individuals. The H3 histone site was only seen at the proximal location of the S9 chromosomes of both 0B and 1B specimens (Figure 1d, e), but the B chromosome did not present rDNA or histone sites (Figure 1h). The chromosome location of the H3-H4 histone gene clusters exhibited high regularity in grasshopper families. Thirty-five Acrididae species analyzed by Cabrero et al., 2009 exhibited a single H3-H4 cluster in an autosome only, which in most cases is the third chromosomal pair. In four Proscopiidae grasshopper species, the number and location of the H3 histone genes were highly conserved, and only one site was present on the fourth chromosome (Cabral-de-Mello et al., 2011). In Romaleidae, the H3 histone gene distribution pattern in four species was observed for the first time. The H3 histone site was restricted to the second autosomal pair in all species examined (Neto et al., 2013).

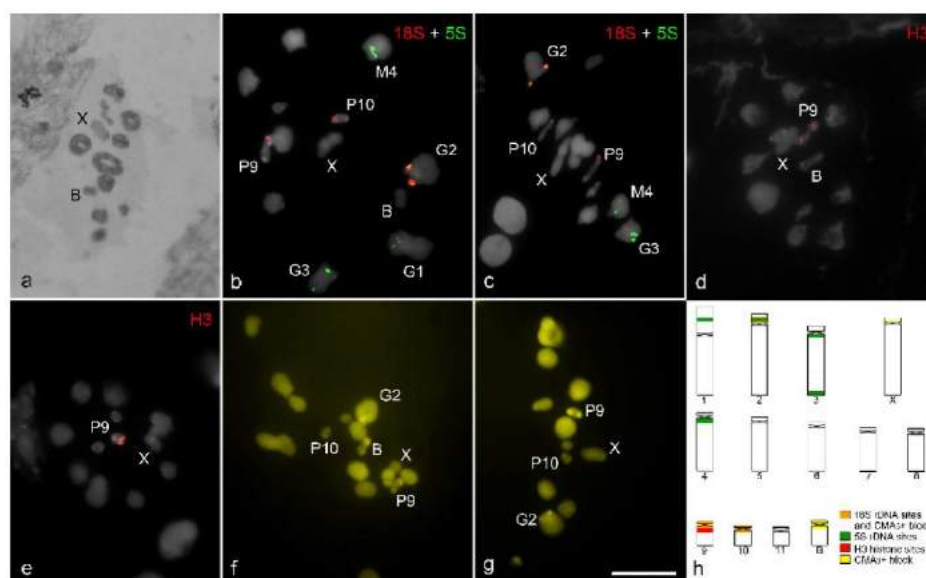


Figure 1. Characterization of B chromosomes in *Ommexecha virens*. (a) Conventional staining of metaphase I from an individual bearing 1B. Locations of 5S and 18S rDNA in (b) 1B and (c) 0B individuals. The 5S rDNA sites (green) are in the L1, L2, L3, and M4 pairs, and the 18S rDNA sites (red) are in L2, S9, and S10 pairs. H3 histone sites in S9 are shown in (d) and (e). CMA₃-positive blocks are shown in (f) 1B and (g) 0B. Note a similar pattern between S9 and B. (h) Idiogram showing 5S/18S rDNA, H3 histone, and CMA₃-positive block distribution patterns in the chromosomal complement. Bar = 10 μ m.

Regarding CMA₃/DA/DAPI staining, CMA₃ positive blocks were observed in the pericentromeric regions of the L2, S9, and S10 chromosomal pairs in 0B and 1B individuals. The small B chromosome showed a CMA₃ pattern that was similar to that of the S9 chromosome

(Figure 1f, g). However, the presence of the 18S/H3 sites observed in the S9 pair was not indicated. Based on the data obtained (Figure 1h), if the small B chromosome observed in *O. virens* originated from the S9 chromosome, it suffered some rearrangements that led to the loss of the 18S rDNA and H3 histone sites present in S9. According to Camacho et al. (2000), B chromosomes may originate from sex chromosomes. In the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae), the B X chromosomes have highly similar morphology, size, and picnosis, but they differed when examined using other techniques (e.g., C-banding and FISH using 5S rDNA) (Loreto et al., 2008). In the case of *X. d. angulatus*, L3 and X chromosomes were excluded as probable B ancestors. In *O. virens*, a probable autosomal origin of the B chromosome was supported, since there was no correspondence in the morphological aspects, FISH, and fluorochrome sites between B and X chromosomes. Therefore, the most likely origin of the *O. virens* B chromosome is the S9 chromosome. If this is the case, the lack of similar repetitive DNA sites indicates that this origin of the B chromosome could be more ancient than indicated by its frequency and genomic disequilibrium. However, we did not entirely reject the possibility of the B chromosome originating from another chromosome. The circumscription to a unique population may be the result of limited migration of individuals among populations. This is the first report of a B chromosome in the Ommexechidae family, but it will be necessary to use other markers in order to more precisely establish the origin of the B chromosome in *O. virens*.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Edital Reuni-UFPE No. 01/2012 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships awarded to T.E. Souza.

REFERENCES

- Araújo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F and Camacho JPM (2001). Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proc. Biol. Sci.* 268: 1127-1131.
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ and Moura RC (2011). 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.* 132: 89-93.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M and Camacho JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435-439.
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M and Camacho JPM (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res.* 17: 397-404.
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000). B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 163-178.
- Carvalho DB, Rocha MF, Loreto V, Silva AEB, et al. (2011). *Ommexecha virens* (Thunberg, 1824) and *Descampsacris serrulatum* (Serville, 1831) (Orthoptera, Ommexechidae): karyotypes, constitutive heterochromatin and nucleolar organizing regions. *Comp. Cytogenet.* 5: 123-132.
- Henriques-Gil N, Santos JL and Arana P (1984). Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 89: 290-293.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz-Réjon M, Ruiz-Réjon C, et al. (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104: 113-120.
- Jones RN (1995). B chromosomes in plants. *New Phytol.* 131: 411-434.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, et al. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced

- from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 2: 87-92.
- Loreto V, Cabrero J, López-León MJ, Camacho JPM, et al. (2008) Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Res.* 16: 233-241.
- Mcallister BF and Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243-253.
- Mesa A and Ferreira A (1977). Cytological studies in the family Ommexechidae (Orthoptera: Acridoidea). *Acrida* 6: 261-271.
- Moscone EA, Matzke MA and Matzke AJM (1996). The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236.
- Neto MS, Souza MJ and Loreto V (2013). Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *Mol. Cytogenet.* 6: 41.
- Nur U (1977). Maintenance of a parasitic B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics* 87: 499-512.
- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, et al. (2004). Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J. Evol. Biol.* 17: 716-719.
- Schweizer D, Mendelak M, White MJD and Contreras M (1983). Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. *Chromosoma* 88: 227-236.
- Walsh PS, Metzger DA and Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.

6. Capítulo III

Estrutura genética populacional do gafanhoto *Ommexecha virens* (Ommexechidae) em habitats fragmentados do Nordeste brasileiro.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Insect Conservation*

ISSN 1566-638

Estrutura genética populacional do gafanhoto *Ommexecha virens* (Ommexechidae) oriundos de populações do Nordeste brasileiro.

Tyago Eufrásio de Souza^{1,2}, Geyner Alves dos Santos Cruz¹, Tania Tassinari Rieger², Rita de Cássia de Moura¹

¹ Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, UPE, Recife, PE

² Laboratório de Experimentação em *Drosophila*, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, PE

Resumo Dentre as espécies de *Ommexecha*, *O. virens* apresenta considerável variabilidade morfológica e cromática, além de apresentar notável área de dispersão, sendo encontrada em ambientes de Caatinga e restinga, ambientes sujeitos a fragmentação e perda de habitat. A diversidade e estruturação genética em oito populações de *O. virens* localizadas no nordeste brasileiro foi avaliada por meio do marcador ISSR. O marcador apresentou um polimorfismo relativamente alto nas populações (79,52%). Entretanto foram observados valores reduzidos de heterozigosidade esperada e específica para as populações, sugerindo diminuição da diversidade genética devido à gargalos populacionais nos ambientes em que as populações foram coletadas. Os valores significativos dos parâmetros F_{st} , G_{st} , θ^H e $G_{st}-B$ apontam para uma estruturação nas populações analisadas, além de ser visto baixo fluxo gênico entre elas ($N_m=0,4688$). As análises do Structure ($K=3$) mostram a ocorrência de um *cluster* gênico geograficamente mais abrangente mais a presença de dois *clusters* genéticos relacionados com duas formações geológicas distintas. Verificamos uma correlação entre o hábito de *O. virens* e os valores encontrados para a estruturação genética, visto a baixa mobilidade da espécie, e a influência de formações geológicas na estrutura genética populacional de *O. virens*.

Palavras-chave Caatinga; Chapada do Araripe; Genética de populações; *Inter simple sequence repeat*; Planalto da Borborema; Restinga

Introdução

Os gafanhotos da família Ommexechidae são endêmicos da América do Sul, com destaque para o gênero *Ommexecha* constituído por sete espécies de ampla distribuição geográfica, encontradas desde os Andes até o Caribe (Ronderos 1978). Entre as espécies deste gênero, *O. virens* apresenta considerável variabilidade morfológica e cromática (Ronderos 1978). Esta ocorre em uma grande variedade de habitats dentre pradarias, Caatinga, Cerrados, restingas, zonas marginais de bosques e florestas (com exceção do Domínio Amazônico) e setores de pés de montanha. Nesses ambientes, *O. virens* é exclusivamente encontrada em áreas caracterizadas por apresentar solos arenosos ou argilo-arenosos com baixo gradiente de umidade e marcada insolação diurna (Ronderos 1978; 1979). Embora apresente a distribuição geográfica mais ampla dentre as espécies de *Ommexecha*, *O. virens*, assim como outras espécies de ommexechídeos, possui baixa

mobilidade, dependendo do salto como principal forma de deslocamento, como visto para outras espécies de *Ommexecha* (Ronderos 1978).

Um dos habitats em que a espécie *O. virens* é amplamente distribuída é a Caatinga, caracterizada por ser um bioma tropical sazonalmente seco endêmico do Brasil. Este bioma ocupa uma área de aproximadamente 840 mil km², que representa em torno de 70% da região Nordeste e 10% do território brasileiro (Castelletti et al. 2003). A Caatinga tem sido severamente alterada devido ao desmatamento atrelado a diversas atividades como a agricultura, caça e pecuária e construções de estradas e cidades, provocando a fragmentação da sua vegetação e consequente perda de habitat (Santos e Tabarelli 2002; Leal et al. 2005). Por sua vez, a restinga, habitat de área costeira onde *O. virens* também é encontrado, é também alvo de intensa fragmentação, especialmente devido à expansão urbana (Oliveira-Filho e Fontes 2000). De uma maneira geral a fragmentação desses habitats provoca modificações na paisagem que consequentemente reflete nas populações remanescentes de *O. virens*, as quais podem se tornar isoladas dada a incapacidade de voo da espécie (Fischer e Lindenmayer 2007; Vandergast et al. 2007; Swift e Hannon, 2010; Rösch et al. 2013). A limitação no deslocamento de insetos desprovidos da capacidade de voo, pode ser um fator importante para a análise da estrutura das populações remanescentes dessas espécies. Compreender a estrutura genética de populações naturais é fundamental, pois dados como o fluxo gênico e distribuição da diversidade genética podem retratar um panorama geral da evolução e adaptação local das populações de gafanhotos em paisagens fragmentadas (Petit et al. 1998; Manel et al. 2003)

Em organismos com pouca ou nenhuma informação de sequência de DNA, uma alternativa viável para acessar a informação genética para fins de estudos de genética populacional é o uso de marcadores do tipo *fingerprinting* como o ISSR (Reddy et al. 2002). Os marcadores ISSR apresentam resultados informativos, de forma que são de excelente custo benefício no estudo do genoma de diferentes espécies (He et al. 2007; Souza et al. 2008; Teneva 2009). Apesar das vantagens a amplificação de *loci* através de ISSR pode gerar um efeito conhecido por *allelic dropout*, ou seja, uma falha estocástica de amplificação em um dos alelos. Assim é recomendável a realização de testes de reprodutibilidade a fim de minimizar esse efeito (Taberlet et al. 1996; Soulsbury et al. 2007). De uma maneira geral, em insetos os marcadores ISSR têm sido empregados com sucesso na caracterização da diversidade genética populacional (De León and Jones 2005; Roux et al. 2007), gerando dados relevantes para o manejo e conservação da variabilidade genética (Vijayan et al. 2006; Vandergast et al. 2007). Em gafanhotos, os estudos a respeito da estrutura genética

populacional baseados em ISSR são recentes e se concentram em representantes da família Acrididae, como nas espécies *Eyprepocnemis plorans* (Manrique-Poyato et al. 2013; 2015) e *Oedaleus infernalis* (Sun et al. 2015). Tais estudos tiveram como intuito a caracterização da estrutura gênica populacional, bem como no entendimento do fluxo gênico entre as populações: em *E. plorans* foi observada uma estruturação populacional significativa, exibindo dois tipos de *clusters* coincidindo com populações com e sem cromossomos B, separadas por barreiras de fluxo gênico; em *O. infernalis* foi sugerido que as distâncias geográficas não desempenham um papel de barreira ao fluxo gênico entre as populações analisadas devido à considerável capacidade de voo da espécie.

Tomando como base que *O. virens* apresenta baixa mobilidade e adaptação específica em ambientes xerófilos, analisamos neste trabalho a estruturação genética populacional dessa espécie em oito populações naturais localizadas em distintas mesorregiões de Caatinga e restinga do Nordeste brasileiro com o intuito de verificar se ocorre conectividade entre elas, além de observar a possível participação de fatores geomorfológicos na estruturação genética de *O. virens*.

Materiais e Métodos

Material biológico e extração de DNA

Um total de 168 indivíduos de *O. virens* foram coletados em oito populações naturais nos Estados de Pernambuco, Ceará e Bahia; localizados no Nordeste do Brasil (Tabela 1; Figura 1). Os indivíduos foram estocados em etanol absoluto e acondicionados em -20 °C. O DNA foi extraído a partir do músculo femural seguindo o protocolo de Aljanabi e Martinez (1997). Posteriormente, o DNA foi purificado através de digestão enzimática por RNase (10 mg/ml) durante 2 h a 37 °C. Em seguida, a concentração do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 % a partir da comparação com GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Amplificação dos Marcadores ISSR

As reações de amplificação por PCR foram realizadas a partir de um volume total de 10 µl contendo 1X PCR buffer, 2,5 mM de dNTPs, 0,2 mM de *primer*, 0,05 U de *Taq* polimerase (Thermo Scientific) e 10 ng de DNA genômico. Os parâmetros de PCR foram 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento para cada *primer* (Tabela 2) por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; posteriormente, extensão final de

72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio (20 mg/ml), e analisados em um sistema de gel-documentação (Gel Logic/Carestream MI SE). O tamanho dos fragmentos amplificados foi verificado utilizando GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Termo Scientific). A partir da análise dos géis foi constituída uma matriz binária de presença/ausência codificada como 1 e 0, respectivamente.

Seleção de *primers*

Inicialmente foram testados 49 *primers* ISSR (University of British Columbia; UBC) em um indivíduo de *O. virens*. Posteriormente, os 13 *primers* que apresentaram maior quantidade de fragmentos de DNA com boa resolução foram utilizados para a etapa de seleção. Estes *primers* foram aplicados em uma amostragem composta por seis indivíduos, sendo três de cada uma das seguintes populações: GOI e STA. A análise dos *primers* mais informativos foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: Número de fragmentos de DNA polimórficos; Índices *PIC* – *Polymorphism Information Content* (Roldán-Ruiz et al., 2000), *MI* - *Marker Index* (Prevost and Wilkinson 1999) e *RP* - *Resolution Power* (Varshney et al., 2007). Além disso, foi calculada a Correlação de Pearson entre os índices *PIC*, *MI* e *RP*. A partir desta análise os 10 *primers* mais informativos (809, 810, 811, 812, 834, 835, 836, 841, 866 e 873) (Tabela 2), foram aplicados nos 168 indivíduos das oito populações estudadas.

Teste de reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos marcadores ISSR foi testada através de análises baseadas em duas rodadas de PCR independentes para todos os 10 *primers* aplicados nas populações. Os *loci* não reprodutíveis foram excluídos da análise genética (Tabela 2).

Análise da estrutura genética populacional

Diversidade genética e estatística F

Baseado no *software* Popgen 1.31 (Yeh et al. 1999) foram calculados porcentagem de *loci* polimórficos (P), índice Informativo de Shannon (I), diversidade genética de Nei (h), identidade e distância genética de Nei entre as populações, número de migrantes (Nm) e coeficiente de diferenciação genética (Gst). A análise de variância molecular (AMOVA),

índice de fixação de Wright (F_{st}) e a heterozigosidade esperada (H_e) média para cada população foram calculados através do *software* Arlequin 3.5 (Excoffier e Lisher, 2010). Com base no modelo populacional escolhido, a partir do *software* Hickory 1.1 (Holsinger et al. 2002) foram verificados os valores de H_s (diversidade genética média para as populações) e H_t (diversidade genética total).

Isolamento por distância (IBD)

O IBD (Wright 1965) foi analisado através da correlação entre distâncias genéticas e geográficas (Teste de Mantel - Sokal and Rohlf 1995) no *software* Arlequin 3.5 (Excoffier e Lisher 2010) a partir de 10.000 permutações e ausência máxima de dados de 20 % (Manrique-Poyato et al. 2013).

Teste de modelo populacional

Os dados gerados foram testados a partir de uma abordagem Bayesiana, no *software* Hickory 1.1 (Holsinger et al. 2002) para quatro diferentes modelos populacionais: i) modelo completo (*full model*) onde os valores de diferenciação populacional (θ , um análogo ao parâmetro F_{st} de Wright) e o endocruzamento (f , um análogo do F_{is}) são diferente de zero, ii) o modelo $f=0$, que assume ausência de endocruzamento dentro das populações, iii) o modelo $\theta=0$, baseado na ausência de diferenciação populacional, e iv) o modelo livre, onde os valores são escolhidos aleatoriamente. A escolha do melhor modelo foi baseada nos parâmetros DIC, um análogo do AIC na seleção por modelos Bayesianos, e D_{bar} , uma medida de quão ajustado o modelo se adapta aos dados analisados (quanto menor o valor de ambos, melhor).

Número de clusters genéticos

Para identificar grupos geneticamente homogêneos dentro da amostragem total, utilizou-se algoritmo Bayesiano implementado no *software* Structure 2.3.1 (Pritchard et al. 2000), assumindo a existência de K populações, caracterizadas por um conjunto de frequências alélicas para cada loco. Utilizou-se o modelo Admixture e de frequências alélicas correlacionadas, sem suposições prévias relativas às populações. Para cada valor de K (de 1 a 10), 10 rodadas independentes foram feitas e, para cada, 600.000 interações foram realizadas após um período de *burn-in* de 60.000 interações. Para estimar o número de

grupos geneticamente homogêneos (K) que melhor ajustam os dados, foi utilizado Structure Harvester website (Earl 2012) que implementa o método de Evanno (Evanno et al. 2005).

Resultados

Os dados de ISSR geraram um total de 83 fragmentos reprodutíveis o que equivale a 90,2 % de reprodutibilidade total. Os fragmentos de DNA amplificados variaram em tamanho entre 300 à 2000 pares de base (pb) nas oito populações. Dentre os 83 *loci* analisados, 66 foram polimórficos (79,52 %), sendo OUR e BEZ as populações que apresentaram maior (53,01 %) e menor (19,28 %) percentagem de polimorfismo, respectivamente (Tabela 3). A estimativa do número de migrantes (Nm) foi de 0,4688, enquanto que, o coeficiente de diferenciação genética (Gst) foi de 0,5161. Em relação aos valores de heterozigosidade esperada (He), as populações BEZ e OUR apresentaram os menores e maiores valores, sendo 0,0680 e 0,21437 (Tabela 3), respectivamente. Adicionalmente, a He média para as populações foi de 0,23287. Os valores de identidade e distância genética de Nei entre as populações estão representados na Tabela 4.

Foi observada estruturação genética significativa entre as populações dado o índice de fixação, Fst: 0,50908. A variação genética (AMOVA) está representada na Tabela 5. Através do Teste de Mantel foi observada correlação positiva e significativa entre as distâncias genética e geográfica (r: 0,427111; P: 0,025000). Os valores par a par de Fst entre as populações variaram entre 0,00090 (BUI e BEZ) e 0,77118 (BAR e SOB) (Tabela 6).

A análise de modelos populacionais apontou o *Full model* e $f = 0$ como sendo melhores modelos (Tabela 7), indicados pelos parâmetros DIC e Dbar (Spiegelhalter et al., 2002). No entanto, o modelo $f=0$, que assume ausência de endogamia dentro das populações, é pouco provável para *O. virens* devido as características biológicas intrínsecas da espécie como o baixo poder de dispersão. Em razão disso, o *Full model* (diferenciação populacional e endogamia diferentes de zero) foi escolhido. Por sua vez, os valores encontrados para a diversidade genética total (Ht) foi de 0,331029 e específica (Hs) de 0,186302, ambos baseados no *Full model* (Tabela 8).

Através da análise de *clusters* genéticos foi observado o maior valor para K=3 (Delta K=148.911710), entretanto um menor valor para K=6 também foi observado (Delta K=113.921357) (Figura 2). Considerando o maior valor estatístico, a área de estudo e as características biológicas de *O. virens*, foi escolhido para discussão dos dados K=3. Desta forma, foram observados três grupos genéticos, formados por: Grupo 1 = ITA + GOI + SOB

+ parte dos indivíduos de OUR; Grupo 2 = BEZ + BUI + STA e Grupo 3 = BAR + parte dos indivíduos de OUR (Figura 3a). Proporção de indivíduos de cada população atribuído a cada *cluster* genético é representado na Tabela 9.

Discussão

A taxa de polimorfismo média de 79,5 % observada em *O. virens* está próxima dos valores geralmente encontrados em estudos baseados em marcadores ISSR com outros insetos (Pradeep et al. 2005; Hundsdoerfer et al. 2005; Roux et al. 2007; Ren et al. 2008; Manrique-Poyato et al. 2013), como a taxa média de 77,3 % observada em populações ibéricas do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Manrique-Poyato et al. 2013). Contudo, grandes variações na taxa de polimorfismo de alguns estudos baseados em ISSR também foram observados como no neuroptero *Chrysoperla externa* (36,32%) (Barbosa et al. 2014), himenóptero *Apis mellifera* (53,66%) (Shouhani et al. 2014) e no gafanhoto praga *Oedaleus infernalis* (95,50%) (Sun et al. 2015).

Considerando os valores de H_e (heterozigosidade esperada) para as populações, encontramos uma variação de 0,0680 a 0,21437, sendo observada um valor médio de 0,23287. Para a heterozigosidade específica (H_s) observamos uma variação entre 0,129195 e 0,272042, sendo o valor médio 0,186302. Com exceção dos valores de H_s visto para ITA, GOI e OUR, tais valores vistos para as outras populações de *O. virens* analisadas são considerados relativamente baixos (abaixo de 0,2) se comparado com os valores de H_s obtidos para outras espécies de gafanhoto, baseados em ISSR, tais como *E. plorans* (Manrique-Poyato et al. 2013) e *Oedaleus infernalis* (Sun et al. 2015). Em populações de insetos naturais sujeitas a fragmentação ambiental, é observada perda da diversidade e, consequentemente, diminuição da heterozigosidade gênica (Hunter 2002; Hill et al. 2006; Potts et al. 2010; Mantyka-pringle et al. 2012). A média dos valores de diversidade genética específica para as populações (H_s) foram menores que os valores de diversidade genética total (H_t) para cada população, sugerindo deficiência heterozigótica nas populações que pode ser relacionada a fatores como, endocruzamento de acordo com o modelo populacional *Full model* (Tabela 9), ou ainda pela subdivisão populacional dada a fragmentação do habitat e possível isolamento das populações remanescentes.

O baixo valor de fluxo gênico e os altos valores de F_{st} e G_{st} encontrados apontam para a estruturação genética observada para as populações de *O. virens*. Ronderos (1978; 1979) descreve *O. virens* como uma espécie morfológicamente variável quanto ao

comprimento das asas, de forma que os indivíduos podem apresentar asas longas (comprimento maior que o abdômen), curtas ou serem ápteros. De modo geral, é considerado que eles adotam o salto como principal meio de deslocamento, visto que não se tem registro de voo. Tais características biológicas inerentes a esta espécie são fatores limitantes para sua dispersão, e consequentemente podem contribuir para a estruturação genética observada nas populações de *O. virens*. Adicionalmente, a estrutura genética dessas populações é diretamente relacionada a suas distribuições geográficas, uma vez que, os dados provenientes do Teste de Mantel mostraram que existe correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas. Além dos dados já apresentados em relação a estruturação genética das populações, os valores encontrados da variabilidade genética entre (50,91) e dentro das populações (49,09) podem indicar que as populações analisadas de *O. virens* estejam possivelmente em processo de diferenciação genética, dada a fragmentação atual dos ambientes e as características de dispersão da espécie. Populações ibéricas do gafanhoto *Mioscirtus wagneri*, que habita exclusivamente regiões de baixas altitudes e hipersalinas, foram analisadas utilizando sequências mitocondriais (Ortego et al. 2009) e microssatélites (Ortego et al. 2010). Os autores observaram uma alta estruturação genética e baixo fluxo gênico entre as populações estudadas, sendo estas consideradas independentes e unidades geneticamente diferenciadas, conclusões atribuídas principalmente ao hábito especialista de *M. wagneri*, semelhante ao observado para *O. virens*.

Com base na análise de clusterização genética foi observado que as populações litorâneas (ITA e GOI) e de Caatinga SOB são compostas pelo *Cluster* genético 1 (vermelho; Fig. 3a; Tabela 7). Estas populações estão distantes entre si 682,32 km (distâncias baseadas no Google Maps). Considerando a provável região de origem da família Ommexechidae (andino-patagônica), o gênero *Ommexecha* teria se irradiado para o restante da América do Sul, no sentido Oeste-Leste, em direção ao litoral sul-americano (Ronderos 1979; Mesa et al. 1990). A presença do *Cluster* genético 1 na população SOB e ITA apoia esta hipótese. O *Cluster* genético 2 (verde; Fig. 3a; Tabela 7) está presente na população BAR que está localizada no sopé da Formação Santana na Chapada do Araripe, no Ceará (Mabesoone e Tinoco, 1973). Neste caso, a Formação Santana pode estar atuando como uma barreira geográfica e assim desempenhando um importante papel para a diferenciação de BAR. Por sua vez, a população OUR é formada por dois *Clusters* genéticos distintos, 1 (vermelho) e 2 (verde) (Fig. 3a; Tabela 7), partilhando os *pools* gênicos presentes em SOB e BAR. É provável que esta população esteja localizada em uma zona híbrida de dispersão entre indivíduos provenientes de populações ao sul e ao norte do rio São Francisco, se

caracterizando como a população mais diversa em relação aos índices de heterozigosidade esperada e específica. Nas populações BEZ, BUI e STA localizadas no Planalto da Borborema, observamos o *Cluster* genético 3 (azul) (Fig. 3a; Tabela 7). Como o Planalto tem sua formação datada de aproximadamente 30 Ma (Oliveira e Medeiros, 2012) e *O. virens* (espécie-tipo do gênero *Ommexecha*) (Ronderos 1978) teria divergido de *Xyleus* (Romaleidae) há aproximadamente 76,74 Ma (Song et al. 2015), provavelmente após o surgimento do Planalto da Borborema as populações localizadas nessa região (BEZ, BUI e STA) foram geograficamente isoladas ao longo dos últimos 40 Ma, e evoluíram formando um *Cluster* genético distinto (3 – azul). Um paralelo acerca da clusterização observada para as populações de *O. virens* analisadas e as formações geológicas observadas para as áreas de coletas (Planalto da Borborema e Chapada do Araripe) pode ser observada na Figura 3 (a e b).

A estruturação genética populacional aqui observada para *O. virens*, pode estar sendo influenciada não só pelo hábito da espécie, como a baixa mobilidade, preferência por ambientes xerófilos e geofílicos, mas também pela topologia das formações geológicas presentes na área do estudo. Podemos observar formações geológicas como barreiras ao fluxo gênico em populações naturais de gafanhotos, tais como formações montanhosas, observadas para *Chorthippus parallelus* (Cooper et al. 1995) e *Oxya hyla intricata* (Li et al. 2011); e gargantas estreitas e áreas áridas, para *E. plorans* (Manrique-Poyato et al. 2015).

Considerando os dados apresentados podemos relacionar fatores como a baixa mobilidade e ocorrência exclusiva desta espécie em ambientes tipicamente arenosos (Ronderos (1978; 1979), além da fragmentação dos ambientes amostrados, como determinantes para a falta de conectividade entre as diferentes populações. Além disso, as formações geológicas (Planalto da Borborema e Chapada do Araripe) encontradas na área do estudo, parecem também desempenhar um importante papel para a estruturação genética observada nas populações de *O. virens*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Edital Reuni-UFPE No. 01/2012 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas a T.E. Souza (Doutorado) e a R.C. Moura (PQ-2, processo 305298/2014-3).

Referências

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22):4692-4693
- Barbosa NC, Freitas SD, Morales AC (2014) Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. *Revista Brasileira de Entomologia* 58(2):203-211
- Castelletti CHM, Santos AMM, Tabarelli M, Silva JMC (2003) Quanto ainda resta da caatinga? Uma estimativa preliminar, p. 719– 734. In: Leal IR, Tabarelli, M and Silva JMC (Eds.). *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife, Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 804 p
- Cooper SJB, Ibrahim KM, Hewitt, GM (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* 4(1):49-60
- De León JH, Jones WA (2005) Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *Journal of Insect Science* 5(1):2
- Earl DA (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4(2):359-361
- Evanno G, Regnaut S, Goudet, J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Excoffier L, Lisher HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3):564–567
- Fischer J, Lindenmayer D (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16:265–280
- He L, Wang S, Miao X, Wu H, Huang Y (2007) Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Sci Int* 168:148–153
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. *Mol Ecol* 11:1157–1164
- Hill JK, Hughes CL, Dytham C, Searle JB (2006) Genetic diversity in butterflies: interactive effects of habitat fragmentation and climate-driven range expansion. *Biology letters* 2(1):152-154
- Hundsdoerfer AK, Kitching IJ, Wink M (2005) The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. *Organisms Diversity & Evolution* 5(3):173-198

- Hunter MD (2002) Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. *Agricultural and Forest Entomology* 4(3):159-166
- Kar PK, Vijayan K, Mohandas TP, Nair CV, Saratchandra B, Thangavelu K (2005) Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. *Genetica* 125(2-3):173-183
- Leal IR, Silva JMC, Tabarelli M, Lacher TE (2005) Changing the course of biodiversity conservation in the caatinga of northeastern Brazil. *Conservation Biology* 19:701–706
- Li T, Zhang M, Qu Y, Ren Z, Zhang J, Guo Y, ... Ma E (2011) Population genetic structure and phylogeographical pattern of rice grasshopper, *Oxya hyla intricata*, across Southeast Asia. *Genetica* 139(4):511-524
- Mabesoone JM, Tinoco IM (1973) Palaeoecology of the Aptian Santana Formation (northeastern Brazil). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 14(2):97-118
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology & evolution* 18(4):189-197
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Cabrero J, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM (2015) Geographical barriers impeded the spread of a parasitic chromosome. *PloS one* 10(6):e0131277
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM (2013) Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *PLoS ONE* 8(3):e5904
- Mantyka-pringle CS, Martin TG, Rhodes JR (2012) Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis. *Global Change Biology* 18(4):1239-1252
- Mesa A, Fontanetti CS, Costa H (1990) The karyotype of the grasshopper *Spathalium helios* Rehn 1918. (Orthoptera, Acridoidea, Ommexechidae). *Revista Brasileira de Genética* 13(4):705-710
- Oliveira RG, Medeiros WE (2012) Evidences of buried loads in the base of the crust of Borborema Plateau (NE Brazil) from Bouguer admittance estimates. *Journal of South American Earth Sciences* 37:60-76
- Oliveira-Filho AT, Fontes MAL (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 34:793–810
- Ortego J, Aguirre MP, Cordero PJ (2010) Population genetics of *Mioscirtus wagneri*, a grasshopper showing a highly fragmented distribution. *Molecular Ecology* 19(3): 472-483
- Ortego J, Bonal R, Cordero PJ, Aparicio JM (2009) Phylogeography of the Iberian populations of *Mioscirtus wagneri* (Orthoptera: Acrididae), a specialized grasshopper inhabiting highly fragmented hypersaline environments. *Biological Journal of the Linnean Society* 97(3):623-633

- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology*, 12(4): 844-855
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution* 25(6):345-353
- Pradeep AR, Chatterjee SN, Nair CV (2005) Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. *Journal of Applied Genetics* 46(3):291
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17
- Ren Z, Zhu B, Wang D, Ma E, Su D, Zhong Y (2008) Comparative population structure of Chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host-plant *Rhus chinensis*. *Genetica* 132(1):103-112
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation* 142(6):1141-1153
- Ronderos RA (1978) Notas para una revisión de la subfamilia Ommexechinae, VIII, El genero *Ommexecha* Serville (Orthoptera, Acridomorpha). *Rev Soc Ent Argentina* 36 (1-4):97-111
- Ronderos RA (1979) La familia Ommexechidae (Orthoptera; Acridoidea). *Acrida* 8(4):241-273
- Rösch V, Tschamntke T, Scherber C, Batary P (2013) Landscape composition, connectivity and fragment size drive effects of grassland fragmentation on insect communities. *Journal of Applied Ecology* 50(2):387-394
- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D, Legal L (2007) ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular phylogenetics and evolution* 43(1):240-250
- Santos AM, Tabarelli M (2002) Distance from roads and cities as a predictor of habitat loss and fragmentation in the Caatinga vegetation of Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 62(4B):897-905
- Shouhany H, Dousti A, Radjabi R and Zarei M (2014) Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *Journal of BioScience & Biotechnology* 3(2)
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry* (3rd ed.). New York: Freeman. pp. 813–819

- Song H, Amédégnato C, Cigliano MM, Desutter-Grandcolas L, Heads SW, Huang Y, Otte D, Whiting MF (2015) 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics* 31:621–651
- Soulsbury CD, Iossa G, Edwards KJ, Baker PJ, Harris S (2007) Allelic dropout from a high-quality DNA source. *Conservation Genetics* 8(3):733-738
- Souza GA, Carvalho MRO, Martins ER, Guedes RNC, Oliveira LO (2008) Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:843–849
- Sun W, Dong H, Gao YB, Su QF, Qian HT, Bai HY, et al. (2015) Genetic Variation and Geographic Differentiation Among Populations of the Nonmigratory Agricultural Pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. *Journal of Insect Science* 15(1):150
- Swift TL, Hannon SJ (2010) Critical thresholds associated with habitat loss: a review of the concepts, evidence, and applications. *Biological Reviews* 85(1):35-53
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N, et al. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic acids research* 24(16):3189-3194
- Teneva A (2009) Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25(5-6):1267-1284
- Vandergast, AG, Bohonak AJ, Weissman DB, Fisher RN (2007) Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmidae: *Stenopelmatus*). *Molecular Ecology* 16:977–992
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, et al. (2006) Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6(1):30
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19:395–420
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) Microsoft Windows-based free ware for population genetic analysis (Release 1.31). University of Alberta, Edmonton
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183

Lista de Tabelas

Tabela 1 Populações e indivíduos coletados (N) de *O. virens*, localização geográfica, geomorfologia e paisagem dos Estados de Pernambuco (PE), Ceará (CE) e Bahia (BA), localizados no Nordeste brasileiro.

Populações	Estado	N	Coordenadas Geográfica		Geomorfologia predominante	Paisagem predominante
Itamaracá (ITA)	PE	23	7° 44' 52"S	34° 49' 32"W	Planície costeira	Restinga
Goiana (GOI)	PE	23	7° 34' 19"S	35° 0' 7"W	Planície costeira	Restinga
Bezerros (BEZ)	PE	23	8° 14' 33"S	35° 47' 7"W	Planalto da Borborema	Transição Floresta Atlântica - Caatinga
Buíque (BUI)	PE	23	8° 36' 51"S	37° 9' 39"W	Planalto da Borborema	Caatinga
Serra Talhada (STA)	PE	23	7° 59' 7"S	38° 17' 34"W	Planalto da Borborema	Caatinga
Ouricuri (OUR)	PE	23	7° 52' 41"S	40° 4' 42"W	Depressão Sertaneja	Caatinga
Barbalha (BAR)	CE	15	7° 18' 20"S	39° 18' 9"W	Chapada do Araripe	Caatinga
Sobradinho (SOB)	BA	15	9° 27' 34"S	40° 49' 31"W	Depressão Sertaneja	Caatinga

Tabela 2 Repetição nucleotídica, temperatura de pareamento (Ta), reprodutibilidade e valores de PIC, MI e RT dos primers ISSR utilizados neste estudo.

Código de primer UBC	Repetição	Ta (°C)	Reprodutibilidade (%)	PIC	MI	RT
809	(AG) ₈ G	52,8	87,5	0,383	4,128	6,333
810	(GA) ₈ T	50,4	100	0,278	2,176	4,333
811	(GA) ₈ C	52,8	80	0,250	1,346	5,000
812	(GA) ₈ A	50,4	90,9	0,167	0,653	3,000
834	(AG) ₈ YT	52,8	100	0,146	0,574	2,333
835	(AG) ₈ YC	52,8	100	0,214	0,989	3,000
836	(AG) ₈ YA	54,0	77,7	0,068	0,305	3,667
841	(GA) ₈ YC	52,8	83,3	0,257	1,729	6,667
866	(CTC) ₆	58,0	100	0,099	0,532	2,000
873	(GACA) ₄	52,0	85,7	0,167	0,769	1,667

Tabela 3 Número total de fragmentos amplificados, porcentagem de *loci* polimórficos (P), diversidade genética de Nei (h), índice informativo de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (He) estimados para as oito populações de *O. virens*.

População	Número total de bandas amplificadas	Porcentagem de <i>loci</i> polimórficos (P)	Diversidade genética de Nei (h)	Índice informativo de Shannon (I)	Heterozigosidade esperada (He)
ITA	1213	42,17	0,1552	0,2301	0,16334
GOI	1261	43,37	0,1638	0,2417	0,1723
BEZ	1223	19,28	0,0650	0,0986	0,0680
BUI	1208	26,51	0,0704	0,1114	0,0739
STA	1226	24,10	0,0880	0,1308	0,0930
OUR	1225	53,01	0,2044	0,2992	0,21437
BAR	808	19,28	0,0694	0,1035	0,07525
SOB	791	22,89	0,0883	0,1300	0,09556

Tabela 4 Valores de identidade genética (acima da diagonal) e a distância genética (abaixo da diagonal) de Nei entre as populações de *O. virens*.

População	ITA	GOI	BEZ	BUI	STA	OUR	BAR	SOB
ITA	****	0,9519	0,8314	0,8372	0,8355	0,8152	0,7029	0,8022
GOI	0,0493	****	0,8078	0,8115	0,8264	0,8231	0,7062	0,8109
BEZ	0,1846	0,2135	****	0,9981	0,9908	0,8877	0,8347	0,8148
BUI	0,1776	0,2089	0,0019	****	0,9853	0,8861	0,8324	0,8160
STA	0,1797	0,1907	0,0092	0,0148	****	0,8981	0,8365	0,8359
OUR	0,2044	0,1947	0,1191	0,1209	0,1074	****	0,9177	0,9398
BAR	0,3526	0,3479	0,1806	0,1835	0,1786	0,0859	****	0,7172
SOB	0,2204	0,2096	0,2048	0,2033	0,1792	0,0621	0,3324	****

Tabela 5 Valores de AMOVA para marcadores ISSR das oito populações analisadas do gafanhoto *O. virens*.

Fonte de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de variação
Entre as populações	7	675,334	4,40879 Va	50,91
Dentro das populações	160	680,243	4,25152 Vb	49,09
Total	167	1355,577	8,66031	

Tabela 6 Valores par a par de Fst entre as populações estudadas de *O. virens*.

População	ITA	GOI	BEZ	BUI	STA	OUR	BAR	SOB
ITA	0,00000							
GOI	0,17346	0,00000						
BEZ	0,57196	0,57631	0,00000					
BUI	0,54922	0,55953	0,00090	0,00000				
STA	0,54737	0,53766	0,05913	0,10557	0,00000			
OUR	0,42751	0,40032	0,41295	0,39976	0,37535	0,00000		
BAR	0,68251	0,66048	0,68989	0,68507	0,64719	0,31737	0,00000	
SOB	0,56119	0,51919	0,71420	0,69616	0,65606	0,21965	0,77118	0,00000

Tabela 7 Parâmetros estatísticos para os diferentes modelos populacionais gerados a partir do *software* Hickory 1.1 para as oito populações de *O. virens*.

Modelo	Dbar	DIC
<i>full</i>	968,24	1210,36
<i>f = 0</i>	963,19	1210,51
<i>θ = 0</i>	5407,11	5468,51
<i>f free</i>	1042,11	1305,72

Tabela 8 Diversidade e estruturação genética em populações de *O. virens*, fornecidos pelo Hickory 1.1 a partir do *Full model*. 2,5% e 97,5%, constituem o intervalo de confiança de 95%.

Parâmetro	Média	s.d.	2.5%	97.5%
θ^I	0,625033	0,0205288	0,585479	0,665127
θ^{II}	0,501513	0,0233432	0,455072	0,54791
θ^{III}	0,412134	0,0109066	0,390631	0,433431
hs[ITA]	0,23977	0,0100792	0,220357	0,260003
hs[GOI]	0,234633	0,0108125	0,213558	0,255821
hs[BEZ]	0,129195	0,0104371	0,109352	0,150543
hs[BUI]	0,148064	0,0113655	0,125989	0,170285
hs[STA]	0,15613	0,00940909	0,138146	0,175293
hs[OUR]	0,272042	0,00872969	0,255696	0,289926
hs[BAR]	0,148972	0,0124455	0,124805	0,173624
hs[SOB]	0,161609	0,0114382	0,13953	0,18464
Hs	0,186302	0,00533441	0,175169	0,196056
Ht	0,331029	0,0041165	0,322486	0,338632
Gst-B	0,43726	0,0122452	0,413361	0,461997

Tabela 9 Proporção de indivíduos de cada população atribuído a cada grupo pelo *software* Structure 2.3.1, com K = 3.

População	N	Grupo 1 (Vermelho)	Grupo 2 (Verde)	Grupo 3 (Azul)
ITA	23	0,972	0,003	0,024
GOI	23	0,990	0,004	0,005
BEZ	23	0,002	0,002	0,995
BUI	23	0,005	0,002	0,991
STA	23	0,004	0,002	0,992
OUR	23	0,555	0,436	0,008
BAR	15	0,002	0,995	0,002
SOB	15	0,983	0,004	0,011

Lista de Figuras

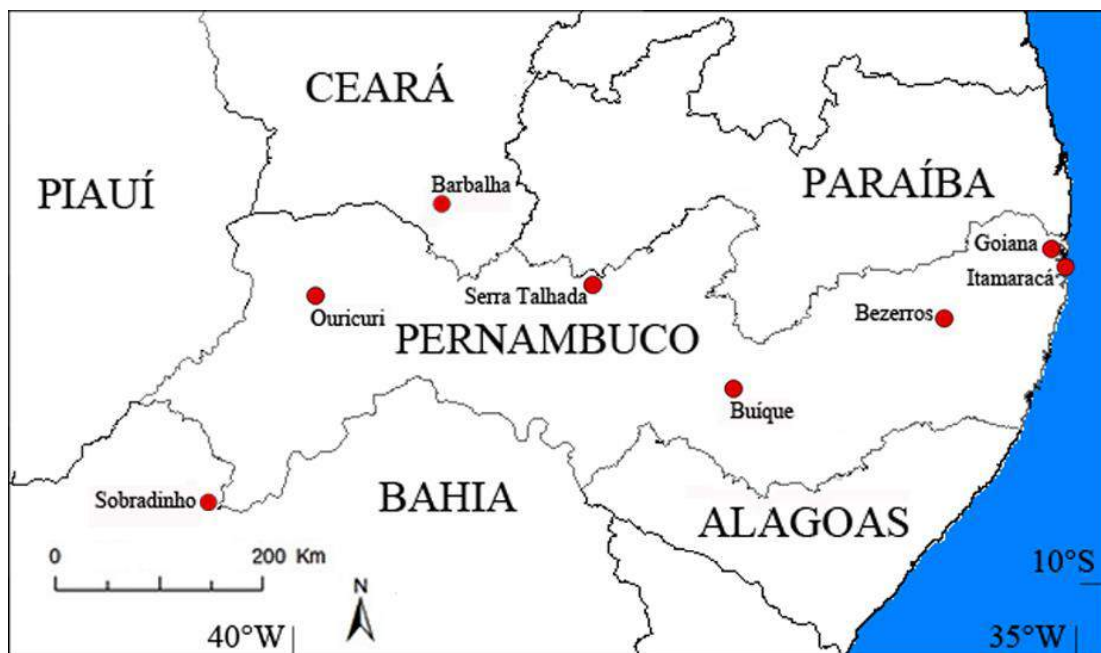


Fig. 1 Mapa das populações de *O. virens* coletadas nos Estados de Pernambuco, Ceará e Bahia.

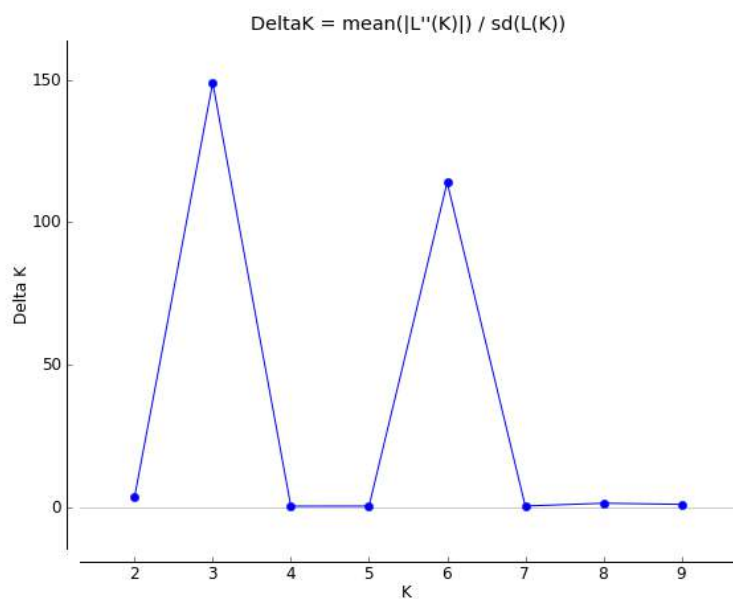


Fig. 2 Valores de delta K no que diz respeito ao K, de acordo com o método de Evanno et al. 2005. Estes resultados foram encontrados utilizando todos os 83 fragmentos de ISSR analisados. Note o pico mais alto de K = 3.

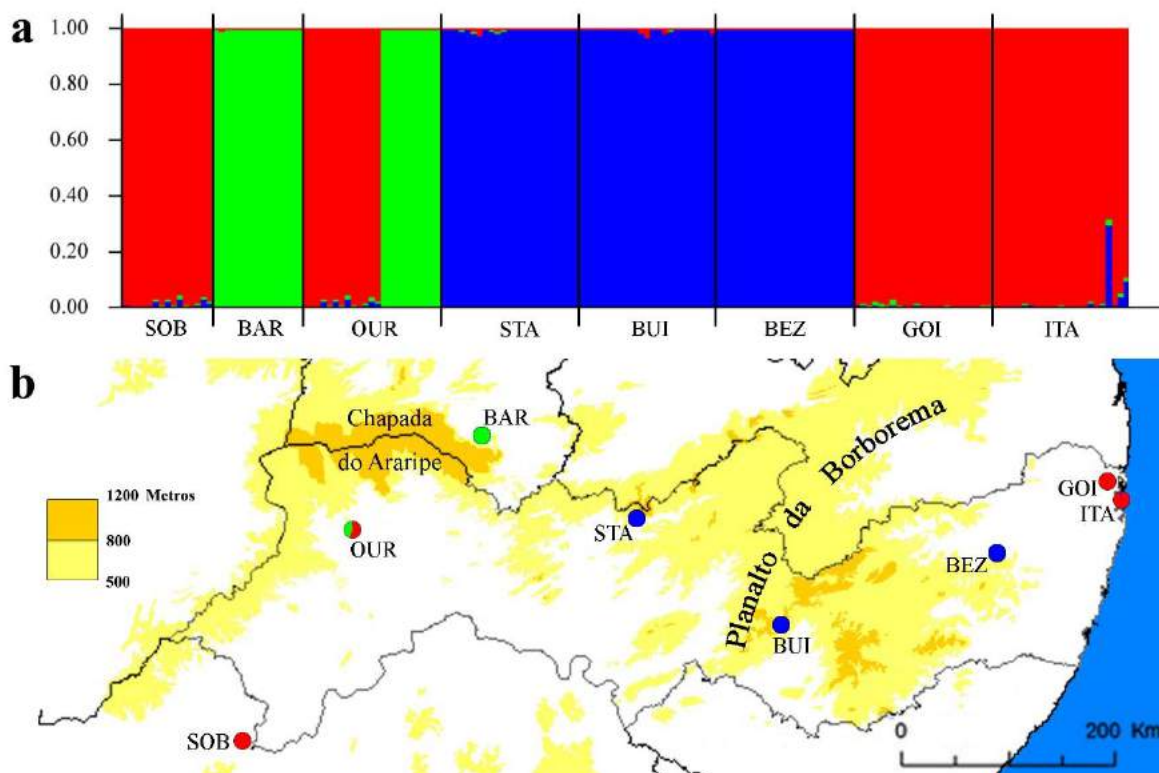


Fig. 3 Estrutura genética e ocorrência geográfica das populações de *O. virens* analisadas. a) Ascendência de cada indivíduo a qualquer um dos três grupos utilizando todos os 83 fragmentos gerados por ISSR, analisados pelo software Structure 2.3.1. b) Localização geográfica das oito populações utilizadas para a análise de ISSR ressaltando as topografias relacionadas às formações Chapada do Araripe e Planalto da Borborema.

7. Discussão geral

Citogenética Comparativa

O mapeamento dos genes de cópia única (*Hsp83*, *Hsp27* e *Ubi* e *Lys*) nas espécies *Ommexecha virens*, *Tropidacris collaris*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Schistocerca pallens* e *Stiphra robusta* aqui analisadas mostrou que existe um padrão de localização conservado no par cromossômico L1. Padrão similar foi observado por Souza *et al.* (2014) nestas espécies, nas quais o gene *Per* também está localizado no par L1. No entanto, para o gene *Hsp70* foi observada a localização no par cromossômico L2. De acordo com Schubert (2007) e Colombo (2013) a conservação da localização cromossômica de genes pode ser devido à ausência ou baixa frequência de rearranjos cromossômicos estruturais, e ainda possivelmente devido ao baixo índice de recombinação ectópica e transposição nas regiões cromossômicas onde estes genes estão localizados. Alguns genes estão localizados na região pericentromérica, que é rica em heterocromatina constitutiva, nas espécies aqui analisadas (Souza *et al.* 1998; Souza e Moura 1999; Souza e Melo 2007; Carvalho *et al.* 2011; Rocha *et al.* 2015), o que pode também estar favorecendo a manutenção da localização dos genes. Provavelmente alguns desses eventos ou a combinação deles seja responsável pela conservação da localização dos genes de resposta à choque térmico e resposta imunológica mapeados neste estudo.

A conservação cromossômica observada nos cromossomos L1 e L2, indica estes cromossomos como sendo possivelmente o locus gênico ancestral para os gafanhotos acridomorfos, os quais pertencem ao grupo superfamília Acridomorpha, que é considerado um grupo monofilético, e compreende a origem das famílias Proscopiidae (*St. robusta*) originada aproximadamente a 183,82 milhões de anos;

Ommexechidae (*O. virens*) e Romaleidae (*T. collaris* e *X. d. angulatus*), que formam um grupo irmão, e que divergiram há aproximadamente 76,74 milhões de anos; e Acrididae (*S. pallens*), que divergiu do ancestral de Ommexechidae e Romaleidae há aproximadamente 84,60 milhões de anos (Song *et al.*, 2015). Por outro lado, quando comparamos a localização de sequências repetitivas (Cabrero e Camacho, 2008; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011a) mapeadas nessas espécies, exceto a *histona H3* na maioria das vezes presente em único par autossômico (Cabrero *et al.*, 2009; Cabral-de-Mello *et al.*, 2011b, Anjos *et al.*, 2013; Neto *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2015), observamos padrões diferenciados de localização dos sítios, os quais podem ser decorrentes de elementos de transposição ou recombinação ectópica, como sugerido por Cabrero e Camacho, (2008); Cabral-de-Mello *et al.* (2011a) e Anjos *et al.* (2015).

Os genes de cópia única mapeados nas espécies examinadas, em geral, mostraram cópias secundárias nos pares cromossômicos médios. Isso indica que possivelmente ocorreu duplicação gênica durante o processo de microevolução cromossômica nessas espécies. Cópias secundárias também foram observadas em espécies de *Drosophila*, tal como observado para o gene *Hsp70* no grupo *D. obscura* (Segarra *et al.*, 1996) e para gene *Ubi* em *D. melanogaster* (Izquierdo, 1994); *D. repleta* e *D. buzzati* (Ranz *et al.*, 1997).

Quanto à localização cromossômica dos genes de cópia única, foram observados 21 sítios (55,26%) intersticiais, oito sítios (21,05%) pericentroméricos e nove sítios (23,68%) distais. A localização preferencial na região intersticial também ocorre para os genes de *histona H3 / H4*, com 88,57% das 35 espécies de Acrididae estudadas apresentando os sítios nesta região (Cabrero *et al.*, 2009). Esta

localização preferencial na região intersticial foi observada também para *Compsacris pulcher* (Acrididae; Gomphocerinae) (Silva-Neto *et al.*, 2015).

Cromossomo B em O. virens

A espécie *Ommexecha virens* apresentou cariótipo ($2n=23,X0$) correspondente ao descrito por Carvalho *et al.* (2011) e ocorrência de cromossomo B em espécimes da população de Sobradinho-BA, com constituição cariotípica $2n=24,X0 + B$ e prevalência de 16%. Valores equivalentes foram descritos para outras espécies de gafanhotos, como 10% em *Melanoplus fêmur-rubrum* (Nur, 1977), 10 a 15% em *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil *et al.*, 1984) e 17,9% em *Rhammatocerus brasiliensis* (Loreto *et al.*, 2008). Em populações onde o cromossomo B surgiu recentemente, essa frequência é geralmente alta (igual ou maior que 25%) (Araújo *et al.*, 2001). Por outro lado, no caso de estabilidade ou extinção do cromossomo B, este número é relativamente baixo (Riera *et al.*, 2004). A frequência de 16% do B na população de *O. virens* presente em Sobradinho-BA pode ser uma indicação de que este cromossomo tem origem antiga e encontra-se estável na população.

Os marcadores cromossômicos usados neste trabalho contribuíram para a indicação da possível origem do cromossomo B em *O. virens*, sendo o par autossômico 9, similar em tamanho, morfologia, picnose e presença de bloco de heterocromatina constitutiva (HC) rico em GC ao cromossomo B. Resultados similares, quanto à origem do B, utilizando marcadores clássicos foram observados em outras espécies de gafanhotos (Bidau *et al.*, 2004; Loreto *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011). Contudo, a ausência no cromossomo B de sítios de *rDNA* 45S e *histona H3* presentes no par 9, foram discordantes com o esperado. Por isso, para

considerar que o cromossomo B de *O. virens* foi originado a partir do par 9, o mesmo deve ter sofrido deleção destas sequências, em particular da *histona H3*, visto que o mesmo está presente apenas no par 9. No entanto, em cromossomos B, a aquisição e manutenção de sequências de DNA repetitivos parece ser mais fácil do que a sua eliminação (Cabrero *et al.*, 1999). De modo, que os dados aqui apresentados (falta de relação entre o B e o cromossomo X, as semelhanças observadas entre o S9 e o B e a frequência do B na população de Sobradinho-BA) ainda não são conclusivos quanto a origem do B em *O. virens*, embora indiquem origem antiga e autossômica, provavelmente a partir do S9 embora não seja possível descartar outros autossomos.

Estrutura genética populacional em O. virens

A taxa de polimorfismo média de 79,5 % observada em *O. virens* está próxima dos valores geralmente encontrados em estudos baseados em marcadores ISSR com outros insetos (Roux *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Manrique-Poyato *et al.*, 2013), como a taxa média de 77,3 % observada em populações ibéricas do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Manrique-Poyato *et al.*, 2013). Contudo, grandes variações na taxa de polimorfismo de alguns estudos baseados em ISSR também foram observados como no neuroptero *Chrysoperla externa* (36,32%) (Barbosa *et al.*, 2014), himenóptero *Apis mellifera* (53,66%) (Shouhani *et al.*, 2014) e no gafanhoto praga *Oedaleus infernalis* (95,50%) (Sun *et al.*, 2015).

Considerando os valores de heterozigosidade específica (Hs), com exceção dos valores vistos para ITA, GOI e OUR, estes valores para as outras populações de *O. virens* analisadas são considerados relativamente baixos (abaixo de 0,2) se comparado com os valores de Hs obtidos para outras espécies de gafanhoto,

baseados em ISSR, tais como os vistos para *E. plorans* (Manrique-Poyato *et al.*, 2013) e *Oedaleus infernalis* (Sun *et al.*, 2015).

Em populações de insetos naturais sujeitas a fragmentação ambiental, é observada perda da diversidade e, conseqüentemente, diminuição da heterozigosidade gênica (Potts *et al.*, 2010; Mantyka-pringle *et al.*, 2012). A média dos valores de diversidade genética específica para as populações (H_s) foram menores que os valores de diversidade genética total (H_t) para cada população, sugerindo deficiência heterozigótica nas populações que pode ser relacionada a fatores como, endocruzamento de acordo com o modelo populacional *Full model* ou ainda pela subdivisão populacional dada a fragmentação do habitat e possível isolamento das populações remanescentes.

O baixo valor de fluxo gênico e os altos valores de F_{st} e G_{st} encontrados apontam para a estruturação genética observada para as populações de *O. virens*. Ronderos (1978; 1979) descreve *O. virens* como uma espécie morfologicamente variável quanto ao comprimento das asas, de forma que os indivíduos podem apresentar asas longas (comprimento maior que o abdômen), curtas ou serem ápteros. De modo geral, é considerado que eles adotam o salto como principal meio de deslocamento, visto que não se tem registro de voo. Tais características biológicas inerentes a esta espécie são fatores limitantes para sua dispersão, e conseqüentemente podem contribuir para a estruturação genética observada nas populações de *O. virens*. Adicionalmente, a estrutura genética dessas populações é diretamente relacionada a suas distribuições geográficas, uma vez que, os dados provenientes do Teste de Mantel mostraram que existe correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas. Além dos dados apresentados em relação a estruturação genética das populações, os valores encontrados da variabilidade

genética entre (50,91) e dentro das populações (49,09) podem indicar que as populações analisadas de *O. virens* estejam possivelmente em processo de diferenciação genética, dada a fragmentação atual dos ambientes e as características de dispersão da espécie.

Com base na análise de clusterização genética foi observado três *Clusters* genéticos distintos (1, 2 e 3). As populações litorâneas (ITA e GOI) e de Caatinga SOB compõem o *Cluster* genético 1. Considerando a provável região de origem da família Ommexechidae (andino-patagônica), o gênero *Ommexecha* teria se irradiado para o restante da América do Sul, no sentido Oeste-Leste, em direção ao litoral sul-americano (Ronderos, 1979; Mesa *et al.*, 1990). A presença do *Cluster* 1 na população SOB e ITA apoia esta hipótese. O *Cluster* 2 está presente na população BAR que está localizada no sopé da Chapada do Araripe, no Ceará. Neste caso, a Chapada do Araripe pode estar atuando como uma barreira geográfica e assim desempenhando um importante papel para a diferenciação de BAR. Por sua vez, a população OUR é formada por dois *Clusters* distintos, 1 e 2, partilhando os *pools* gênicos presentes em SOB e BAR; é provável que esta população esteja localizada em uma zona híbrida de dispersão entre indivíduos provenientes de populações ao sul e ao norte do rio São Francisco, se caracterizando como a população mais diversa em relação aos índices de heterozigosidade esperada e específica. Nas populações BEZ, BUI e STA localizadas no Planalto da Borborema, observamos o *Cluster* 3. Como o Planalto tem sua formação datada de aproximadamente 30 Ma (Oliveira e Medeiros, 2012) e *O. virens* (espécie-tipo do gênero *Ommexecha*) (Ronderos, 1978) teria divergido de *Xyleus* (Romaleidae) há aproximadamente 76,74 Ma (Song *et al.*, 2015), provavelmente após o surgimento do Planalto da Borborema as populações

localizadas nessa região (BEZ, BUI e STA) foram geograficamente isoladas e ao longo dos últimos 40 Ma, e evoluíram formando um *Cluster* genético distinto (3).

A estruturação genética populacional aqui observada para *O. virens*, pode estar sendo influenciada não só pelo hábito da espécie, como a baixa mobilidade, preferência por ambientes xerófilos e geofílicos, mas também pela topologia das formações geológicas presentes na área do estudo. Considerando os dados apresentados podemos relacionar fatores como a baixa mobilidade e ocorrência exclusiva desta espécie em ambientes tipicamente arenosos (Ronderos, 1978; 1979), além da fragmentação dos ambientes amostrados, como determinantes para a falta de conectividade entre as diferentes populações. Além disso, as formações geológicas (Planalto da Borborema e Chapada do Araripe) encontradas na área do estudo, parecem também desempenhar um importante papel para a estruturação genética observada nas populações de *O. virens*.

8. Conclusões

1. A localização preferencial dos genes de cópia única (*Hsp83*, *Hsp27*, *Ubi* e *Lys*) nos pares cromossômicos L1 e dos genes *Hsp70* e *Ubi* no L2 nas espécies analisadas, indica: i) conservação cromossômica decorrente possivelmente da ausência ou baixa frequência de rearranjos cromossômicos, e proximidade dos genes a regiões ricas em heterocromatina constitutiva; ii) que os cromossomos L1 e L2 são portadores dos *locus* gênicos ancestrais dos genes de choque térmico e imunidade primária aqui analisados; e iii) que o mapeamento dos genes de cópia única em comparação ao de sequências repetitivas pode contribuir mais efetivamente para compreensão da evolução cromossômica do grupo Acridomorpha;
2. O cromossomo B de *O. virens* apresenta: i) origem antiga e autossômica, possivelmente a partir do S9, e ii) estabilidade na população de Sobradinho-BA;
3. A diferenciação com tendência a estruturação genética observada nas populações de *O. virens*, decorre: i) da adaptação da espécie a ambiente xerófilo e sua limitação de dispersão (baixa mobilidade); ii) conjuntamente com o isolamento e topologia das formações geológicas (Planalto da Borborema e Chapada do Araripe) presentes nos ambientes amostrados.

9. Referências Bibliográficas

- Adamo SA (2004) Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology* 50: 209 – 216.
- Adamo SA (2010) Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior and Immunity* 24: 194 - 200.
- Agarwal M, Shrivastava N and Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617–631.
- Alexander RD (1960) Sound communication in Orthoptera and Cicadidae. In *Animal sounds and communication* (Vol. 7, pp. 38-92). Washington: American Institute of Biological Sciences.
- Al-Otaibi SA (2008) Genetic variability in mite-resistant honey bee using ISSR molecular markers. *Arab Journal of Biotechnology* 11: 241-252.
- Amédégnato C (1974) Les genres d'acridiens neotropicaux, leur classification par familles, sous-familles et tribus. *Acrida* 3: 193– 203.
- Anne C (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 127(1-3): 101-120.
- Anjos A, Loreto V, and Souza MJ (2013) Chromosome mapping of ribosomal genes and histone H4 in the genus *Radacridium* (Romaleidae). *Genetics and molecular biology* 36(3): 336-340.
- Anjos A, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JPM, Loreto V, Cabrero J, Souza MJ and Cabral-de-Mello DC (2015) U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. *Heredity*: 1–13.
- Bakkali M, Cabrero J, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM (2001) Population differences in the expression of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Protoplasma* 217(4): 185-190.
- Barbosa NC, Freitas SD and Morales AC (2014) Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. *Revista Brasileira de Entomologia* 58(2): 203-211.
- Barrientos LL (1995) The Present State of the Locust and Grasshopper Problem in Brazil. *J Orthoptera Res* 4: 61-64.
- Behura SK (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15: 3087- 3113.
- Behura SK, Sahu SC, Mohan M and Nair S (2001) *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Molecular Biology* 10: 163–171.
- Bensasson D, Petrov DA, Zhang DX, Hartl DL and Hewitt GM (2001) Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers. *Molecular Biology and Evolution* 18(2): 246-253.
- Bensasson D, Zhang DX and Hewitt GM (2000) Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17(3): 406-415.
- Bensch S and Åkesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899–2914.

- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* 73(3): 328-336.
- Bidau CJ and Marti DA (2000) Meiosis and the Neo-XY system of *Dichroplus vittatus* (Melanoplinae, Acrididae): a comparison between sexes. *Genetica* 110(2): 185-194.
- Bidau CJ, Rosato M and Martí DA (2004) FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distortion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). *Cytogenetic and Genome Research* 106(2-4): 295-301.
- Bidau, CJ (1987) Influence of a rare unstable B-chromosome on chiasma frequency and nonhaploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). *Genetica* 73(3): 201-210.
- Boylan J, La Valle, F and Kang Y (2009) Determination of genetic relationships among populations of *Asclepias tuberosa* (Asclepiadaceae) based on ISSR polymorphisms. *Bios* 80(1): 25-34.
- Bringmann P and Lührmann R (1986) Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *EMBO J* 5: 3509–3516.
- Brockhouse C, Bas JAB, Fereday RM and Strauss NA (1989) Supernumerary chromosomes evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32: 516–521.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM and 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(6): e66532.
- Bugrov A and Gozeva S (1998) Neo-XY chromosome sex determination in four species of the Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae) from Bulgaria. *Caryologia* 51: 115–121.
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN, Warchałowska-Śliwa E, ... and Rubtsov NB (2007) DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh.(Orthoptera, Acrididae). *Chromosome research* 15(3): 315-326.
- Buzzi, ZJ (2005) *Entomologia didática*. 4^a ed., Curitiba, Editora UFPR, 347 pp.
- Cabral-de-Mello DC and Martins C (2010) Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as models. *Microscopy: Science, technology, applications and education* 1: 658-669.
- Cabral-de-Mello DC, Cabrero J, López-León MD and Camacho JPM (2011a) Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica* 139: 921–931.
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ and Moura RC (2011b) 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* 132: 89–93.
- Cabrero J and Camacho JPM (1986) Cytogenetic studies in Gomphocerine grasshoppers. 2. Chromosomal location of active Nucleolar Organizing Regions. *Can J Genet Cytol* 28: 540-544.

- Cabrero J and Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Res* 16: 595–607.
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, Warchalowska-Sliwa E, López-León MD, Perfectti F and Camacho JPM (2003) Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112(4): 207–211.
- Cabrero J, López-León MD, Bakkali M and Camacho JPM (1999) Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435–439.
- Cabrero J, López-León MD, Teruel M and Camacho JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res* 17(3): 397–404.
- Camacho JPM, Cabrero J, López-León MD, Bakkali M and Perfectti F. (2003) The B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. *Genetica* 117(1): 77–84.
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond* 355: 163–178.
- Camacho, JPM (2005) B chromosomes, 223–286 pp. In: *The Evolution of the Genome*, 1^a Ed., edited by Gregory, TR.
- Campos SRC, Rieger TT and Santos JF (2007) Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by in situ hybridization in *Zaprionus indianus*. *Genet Mol Res* 6(2): 262–276.
- Carbonell CS (1977) Origin, evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): A preliminary hypothesis. *Rev Soc Ent Argentina* 36(1-4): 153–175.
- Carbonell CS (1986) Revision of the neotropical genus *Tropidacris* (Orthoptera; Acridoidea; Romaleidae; Romaleinae). *Proc Acad Nat Sci Phil* 138(2): 366–402.
- Carbonell CS (2004) The genus *Xyleus* Gistel 1848 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae) *J Orthoptera Res* 13(1): 63–133.
- Cardoso H and Dutra A (1979) The neo-X neo-Y sex pair in Acrididae, its structure and association. *Chromosoma* 70: 323–336.
- Carlson WR (1986) The B chromosome of maize. *CRC Crit Rev Plant Sci* 3: 201–226.
- Carvalho DB, Rocha MF, Loreto V, Silva AEB and Souza MJ (2011) *Ommexecha virens* (Thunberg, 1824) and *Descampsacris serrulatum* (Serville, 1831) (Orthoptera, Ommexechidae): karyotypes, constitutive heterochromatin and nucleolar organizing regions. *Comp Cytogen* 5(2): 123–132.
- Castillo ER, Marti DA and Bidau CJ (2010) Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. *Journal of Orthoptera Research* 19(2): 213–231.
- Chahbar N, Muñoz I, Dall’Olio R, De la Rúa P, Serrano J and Doumandji S (2013) Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *Journal of insect conservation* 17(2): 385–392.
- Chapman RF and Joern, A (eds.) (1990) *Biology of Grasshoppers*. John Wiley & Sons, New York 576 pp.
- Chiavarino AM, González-Sánchez, M, Poggio L, Puertas MJ, Rosato M and Rosi P (2001) Is maize B chromosome preferential fertilization controlled by a single gene? *Heredity* 86(6): 743–748.

- Colombo PC (2013) Micro-evolution in grasshoppers mediated by polymorphic Robertsonian translocations. *Journal of Insect Science* 13(1): 43.
- Daffre S, Kylsten P, Samakovlis C and Hultmark D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics* 242(2): 152-162.
- De León JH and Jones WA (2005) Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *Journal of Insect Science* 5(1): 2.
- Demakov SA, Gorchakov AA, Schwartz YB, Semeshin VF and Zhimulev IF (2001) Analysis of DNA Interband Regions 3A5/A6, 3C5-6/C7, and 60E8-9/E10 in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics* 37(11): 1247–1256.
- Dirsh VM (1975) Classification of the Acridomorphoid Insects. E.W. Classey Ltd., Faringdon.
- Domenico FC (2007) Revisão do gênero *Tetanorhynchus* Brunner von Wattenwyl, 1980 (Orthoptera, Caelifera, Proscopiidae). Dissertação (Mestrado em Ciências, Zoologia), Universidade de São Paulo.
- Drosopoulou E, Konstantopoulou I and Scouras ZG (1996) The heat shock genes in the *Drosophila montion* subgroup: chromosomal localization and evolutionary implications. *Chromosoma* 105: 104 - 110.
- Eades DC (2000) Evolutionary relationships of phallic structures of Acridomorpha (Orthoptera). *J Orthoptera Res* 9: 181–210.
- Eades DC, Otte D, Cigliano MM and Braun H. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. Acessado em 24/12/2015; 16:20.
- Egizi A and Fonseca DM (2015) Ecological limits can obscure expansion history: patterns of genetic diversity in a temperate mosquito in Hawaii. *Biological Invasions* 17(1): 123-132.
- Evgen'ev MB, Zatsepina OG, Garbuz D, Lernman DN, Velikodvorskaya V, Zelentsova E and Feder ME (2004) Evolution and arrangement of the hsp70 gene cluster in two closely related species of *virilis* group of *Drosophila*. *Chromosoma* 113: 223-232.
- Feder ME and Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61(1): 243-282.
- Fischer J and Lindenmayer D (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16: 265–280.
- Flook PK, Klee S and Rowell CHF (1999) Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Syst Biol* 48: 233–253.
- Flook PK, Klee S and Rowell CHF (2000) Molecular phylogenetic analysis of the Pneumoroidea (Orthoptera, Caelifera): molecular data resolve morphological character conflicts in the basal Acridomorpha. *Mol Phylogenet Evol* 15: 345–354.
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N and Snyder PK (2005) Global consequences of land use. *Science* 309: 570–574.

- Fox DP, Hewitt GM and Hall DJ (1974) DNA replication and RNA transcription of euchromatic and heterochromatic chromosome regions during grasshopper meiosis. *Chromosoma* 45: 43–62.
- Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti FE, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS and Omoto C (2002) *Entomologia agrícola*. FEALQ, Piracicaba, Brasil, 920 pp.
- Gangwere SK, Muralirangan MC and Muralirangan M (Eds.) (1997) *The Bionomics of Grasshoppers, Katydid, and Their Kin*. CAB International, New York.
- González-Sánchez M, Gonzalez-Gonzalez E, Molina F, Chiavarino AM, Rosato M and Puertas MJ (2003) One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene (s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90(2): 122-129.
- Gradish AE, Keyghobadi N and Otis GW (2015) Population genetic structure and genetic diversity of the threatened White Mountain arctic butterfly (*Oeneis melissa semidea*). *Conservation Genetics* 16(5): 1253-1264.
- Green DM (1988) Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma* 97: 55–70.
- Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J and Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Gurney AB (1976) Book Review: classification of the Acridomorphoid Insects. *Bull Entomol Soc Am* 22: 30.
- Hausdorf B and Hennig C (2010) Species Delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology* 59: 491-503.
- Hedges SW (2008) The first fossil Proscopiidae (Insecta, Orthoptera, Eumastacoidea) with comments on the historical biogeography and evolution of the family. *Palaeontology* 51(2): 499-507.
- Hewitt GM (1979) *Animal Cytogenetics*, vol. 3, Insecta 1. Orthoptera. Grasshoppers and crickets. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Hill JK, Hughes CL, Dytham C and Searle JB (2006) Genetic diversity in butterflies: interactive effects of habitat fragmentation and climate-driven range expansion. *Biology Letters* 2(1):152-154.
- Hollingsworth P M and Ennos RA (2004) Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92: 490–498.
- Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN and Forster JW (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 105, 97-103.
- Hundsdoerfer AK, Kitching IJ and Wink M (2005) The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. *Organisms Diversity & Evolution* 5(3): 173-198.
- Hunter MD (2002) Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. *Agricultural and Forest Entomology* 4(3): 159-166.
- Hurst GD and Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceeding of Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 272: 1525–1534.

- Ishak B, Jaafar H, Maetz JL and Rumpler Y (1991) Absence of transcriptional activity of the B-chromosome of *Apodemus peninsulae* during pachytene. *Chromosoma* 100: 278–281.
- Izquierdo M (1994) Ubiquitin genes and ubiquitin protein location in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma* 103: 193–197.
- Jago ND (1989) The genera of the Central and South american grasshopper Family Proscopiidae (Orthoptera: Acridomorpha) EOS Madrid 65(1): 249–307.
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruíz-Réjon M, Ruíz-Réjon C and Parker JS (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104: 113–120.
- Jonah PM, Bello LL, Lucky O, Midau A and Moruppa SM (2011) Review: The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research* 11(5).
- Jones RN (1991) B-chromosome drive. *Am Nat* 137: 430–442.
- Kambhampati S and Smith PT (1995) PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4: 233–236.
- Kandpal RP, Kandpal G and Weissman SM (1994) Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(1): 88–92.
- Kevan DKM (1976) Book Review: classification of the Acridomorphoid Insects. *S Afr J Sci* 72: 316–319.
- Kevan DKM (1982) Orthoptera. In: Parker, S.P. (Ed.) *Synopsis and Classification of Living Organisms*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, pp 352–383.
- Kumar NS and Gurusubramanian G (2011) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis* 11(3): 116–124.
- Lanave C, Licciulli F, De Robertis M, Marolla A and Attimonelli M (2002). Update of AMmtDB: a database of multi-aligned Metazoa mitochondrial DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 30(1): 174–175.
- Leavitt JR, Hiatt KD, Whiting MF and Song H (2013) Searching for the optimal data partitioning strategy in mitochondrial phylogenomics: a phylogeny of Acridoidea (Insecta: Orthoptera: Caelifera) as a case study. *Mol Phylogenet Evol* 67: 494–508.
- Lee DH, Seo MJ, Kang EJ, Park CR, Jo CW, Hwang IC ... and Youn YN (2011) Molecular identification of AFLP fragments associated with elytra color variation of the Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14(1): 99–105.
- Lima IM and Andrade LH (2002) Postembryonic development of *Stiphra* sp. X (Orthoptera: Proscopiidae) feeding on *Psidium guaiava* L. (Myrtaceae) leaves in the laboratory. *Journal of Orthoptera Research* 11(2): 119–124.
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55(1): 1151–1191.
- Li YC, Korol AB, Fahima T and Nevo E (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 991–1007.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11(12): 2453–2465.

- López-León MD, Cabrero J, Pardo MC, Viseras E, Camacho JPM and Santos JL (1993) Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). *Heredity* 71: 352-352.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (Pat), Hewitt GM and Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2(2): 87-92.
- Loreto V and Souza MJ (2000) Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Belosacris coccineipes* (Acrididae-Leptysminae). *Genetic and Molecular Biology* 23: 1-5.
- Loreto V, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM and Souza MJ (2008) Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Res* 16: 233 – 241.
- Loreto V, Stadler E, Melo NF and Souza MJ (2005) A comparative cytogenetic analysis between the grasshopper species *Chromacris nuptialis* and *C. speciosa* (Romaleidae): constitutive heterochromatin variability and rDNA sites. *Genetica* 125(2-3): 253-260.
- Lunt DH, Hutchinson WF and Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology* 8: 893–894.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM et al. (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153–165.
- Luque C, Legal L, Staudter H, Gers C and Wink M (2002) ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136(3): 251-253.
- Machado CB, Silva-Neto LC, Loreto V and Souza MJ (2014) B chromosome prevalence and physical mapping of 18S rDNA and H4 histone sites in the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae). *Genetics and Molecular Research* 13(3): 7052-7060.
- Machkour-M'Rabet S, Hénaut Y, Dor A, Pérez-Lachaud G, Pélissier C, Gers C and Legal L (2009) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). *Journal of Arachnology* 37(1): 10-14.
- Magalhães BP and Lecoq M (2006) (Eds) Bioinseticida e gafanhotos-praga. Relatório final do projeto: Desenvolvimento de bioinseticidas para controle de gafanhotos-praga no Brasil. CIRAD, Embrapa.
- Mahar KS, Rana, TS, Ranade, SA, Pande V and Palni LMS (2013) Estimation of genetic variability and population structure in *Sapindus trifoliatus* L., using DNA fingerprinting methods. *Trees* 27(1): 85-96.
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Cabrero J, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM (2015) Geographical Barriers Impeded the Spread of a Parasitic Chromosome. *PLoS ONE* 10(6): e0131277.
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Gómez R, Perfectti F, Camacho JPM (2013) Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *PLoS ONE* 8(3): e5904.
- Matt S, Flook PK and Rowell CHF (2008) A partial molecular phylogeny of the Eumastacoidea s. lat. (Orthoptera, Caelifera). *J Orthoptera Res* 17: 43–55.

- Mantyka-pringle CS, Martin TG and Rhodes JR (2012) Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis. *Global Change Biology* 18(4):1239-1252.
- Mcallister BF and Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243-253.
- McGregor CE, Lambert CA, Greyling MM, Louw JH and Warnich L (2000) A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113(2): 135-144.
- Mendki MJ, Sharma AK, Veer V, Agrawal OP, Prakash S and Parashar, BD (2011) Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4(5): 357-362.
- Mesa A and Ferreira A (1977) Cytological studies in the family Ommexechidae (Orthoptera-Acridoidea). *Acrida* 6: 261–271.
- Mesa A and Ferreira A (1978) The chromosomes of South American Eumastacids (Orthoptera: Eumastacidae) and discussion of the phylogeny of the family. *Acrida* 7: 157–163.
- Mesa A and Ferreira A (1981) Have the Australian Morabinae and the neotropical Proscopiidae evolved from a common ancestor? A cytogenetic point of view (Orthoptera, Caelifera, Eumastacoidea). *Acrida* 10: 205–217.
- Mesa A, Ferreira A and Carbonell CS (1982) Cariología de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. *Annis Soc Ent Fr* 18: 526.
- Mesa A, Fontanetti CS and Costa H (1990) The karyotype of the grasshopper *Spathalium helios* Rehn 1918. (Orthoptera, Acridoidea, Ommexechidae). *Revista Brasileira de Genética* 13(4): 705-710.
- Mesa A, Fontanetti CS and García Novo P (2001) Does an X-autosome centric fusión in Acridoidea condemn the species to extinction? *Journal of Orthoptera Research* 10: 141–146.
- Micheneau C, Fournel J, Warren BH, Hugel S, Gauvin-Bialecki A, Paillet T, ... and Chase MW (2010) Orthoptera, a new order of pollinator. *Annals of botany* 105(3): 355-364.
- Milani D and 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.
- Miño CI, Gardenal CN and Bidau CJ (2011). Morphological, genetic, and chromosomal variation at a small spatial scale within a mosaic hybrid zone of the grasshopper *Dichroplus pratensis* Bruner (Acrididae). *Journal of Heredity* 102(2): 184–195.
- Montiel EE, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, Marchal JA, Sánchez A, Perfectti F, López-León MD and Camacho JPM (2015) Intragenomic distribution of RTE retroelements suggests intrachromosomal movement. *Chromosome Research* 23(2): 211-223.
- Moura RC, Souza MJ, Tashiro T (1996) Cytogenetics characterization of the genera *Scleratoscopiia* and *Tetanorhyncus* (Orthoptera, Proscopiidae). *Cytologia* 61: 169–178.
- Mueller UG and Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* 14(10): 389-394.

- Munoz-Pajares AJ, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM and Perfectti F (2011) A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics* 187(3): 853-863.
- Navajas M and Fenton B (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology* 24: 751–774.
- Neto MS, Souza MJ and Loreto V (2013) Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *Molecular Cytogenetics* 6:41.
- Nunes AL (1996) Aspectos ecológicos, ação predatória de *Phlugis teres* (De Geer, 1927) (Orthoptera-Tettigoniidae) e avaliação do seu potencial para o controle biológico de pragas em cultivares na várzea amazônica. Manaus, INPA/UA, Tese de doutorado.
- Nur U (1962) A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in the lecanoid genetic system. *Chromosoma* 13: 249–271.
- Nur U (1977) Maintenance of a “parasitic” B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Chromosoma* 68: 165–185.
- Nur U and Brett BLH (1987) Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealybug, *Pseudococcus affinis* (*obscurus*). *Genetics* 115(3): 499-510.
- Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C and Moura RC (2011) Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5SrDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Mol Cytogen* 4(1): 1.
- Oliveira RG and Medeiros WE (2012) Evidences of buried loads in the base of the crust of Borborema Plateau (NE Brazil) from Bouguer admittance estimates. *Journal of South American Earth Sciences* 37: 60-76.
- Ostrander EA, Jong PM, Rine J and Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(8): 3419-3423.
- Palacios-Gimenez OM, Castillo ER, Martí DA and Cabral-de-Mello DC (2013) Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology* 13: 167.
- Palestis BG, Cabrero J, Trivers R and Camacho JPM (2010) Prevalence of B chromosomes in Orthoptera is associated with shape and number of A chromosomes. *Genetica* 138(11-12): 1181-1189.
- Palma J, Maebe K, Guedes JVC, Smagghe G (2015) Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includes* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil. *PLoS ONE* 10(3): e0121260.
- Pardo-Manuel de Villena F and Sapienza C (2001a) Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. *Genetics* 159: 1179–1183.
- Pardo-Manuel de Villena F and Sapienza C (2001b) Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females. *Mamm Genome* 12: 331–339.
- Pazza R, Kavalco KF, Prioli SMAP, Prioli AJ and Bertollo LAC (2007) Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 35:843-851.
- Pener MP and Simpson SJ (2009) Locust phase polyphenism: an update. *Adv In Insect Phys* 36: 1–286.

- Pereira LG and Souza MJ (2000) Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae: Orthoptera). *Cytobios* 103: 111–119.
- Perfectti F and Werren JH (2001) The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* 55(5): 1069-1073.
- Perfectti F, Corral JM, Mesa JA, Cabrero J, Bakkali M, López-León MD and Camacho, JPM (2004) Rapid suppression of drive for a parasitic B chromosome. *Cytogenetic and Genome Research* 106(2-4): 338-343.
- Pfadt RE (1994) Field guide to common western grasshoppers (Vol. 912). Wyoming Agricultural Experiment Station.
- Phillipsen IC and Lytle DA (2013) Aquatic insects in a sea of desert: population genetic structure is shaped by limited dispersal in a naturally fragmented landscape. *Ecography* 36: 731–743.
- Poderoso JCM, Da Costa MKM, Correia-Oliveira ME, Dantas PC, Zanuncio JC and Ribeiro GT (2013) Occurrence of *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Acridoidea: Romaleidae) damaging *Casuarina glauca* (Casuarinaceae) plants in the municipality of central Bahia, Brazil. *The Florida Entomologist* 96: 268–269.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O and Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25(6): 345-353.
- Pradeep AR, Chatterjee SN and Nair CV (2005) Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. *Journal of Applied Genetics* 46(3): 291.
- Ranz JM, Casals FC and Ruiz A (2001) How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. *Genome Research* 11: 230-239.
- Ranz JM, Segarra C and Ruiz A (1997). Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* 145: 281-295.
- Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M and Muehlbauer FJ (1998) Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics* 97(4): 515-519.
- Ré D, Cenzi F, Gustani EC, Oliveira APF, Machado LP, Mateus RP, ... and Robe LJ (2014) Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. *Biological Journal of the Linnean Society* 112(1): 55- 66.
- Reddy MP, Sarla N and Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1): 9-17.
- Ren Z, Zhu B, Wang D, Ma E, Su D and Zhong Y (2008) Comparative population structure of Chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host-plant *Rhus chinensis*. *Genetica* 132(1): 103-112.
- Rieger TT, Oliveira-Silva SV, Pacheco IA, Chagas BS and Santos JF (2007) Localization of HSP single-copy genes by inexpensive, permanent non-fluorescent in situ hybridization on meiotic chromosomes of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Acrididae). *Genet Mol Res* 6(3): 643-649.
- Riera L, Petitpierre E, Juan C, Cabrero J, *et al.* (2004) Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J Evol Biol* 17: 716-719.

- Rocha MF, Souza MJ and Moura RC (2004) Karyotypic analysis, constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). *Caryologia* 57: 107-116.
- Rocha MF, Souza MJ and Tashiro T (1997) Karyotype variability in the Genus *Radacridium* (Orthoptera; Romaleidae). *Cytologia* 62:53–60.
- Rocha MF, Pine MB, Oliveira EFAS, Loreto V, Gallo RB, Silva CRM, Domenico FC and Rosa R (2015) Spreading of heterochromatin and karyotype differentiation in two *Tropidacris* Scudder, 1869 species (Orthoptera, Romaleidae). *Comp Cytogen*, 9(3): 435–450.
- Rocha MF (2002) Caracterização citogenética em espécies de gafanhotos das famílias Acrididae e Romaleidae (Orthoptera). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Ronderos RA (1978) Notas para una revisión de la subfamilia Ommexechinae, VIII, El genero *Ommexecha* Serville (Orthoptera, Acridomorpha). *Rev Soc Ent Argentina* 36 (1-4): 97-111.
- Ronderos RA (1979) La familia Ommexechidae (Orthoptera; Acridoidea). *Acrida*, 8(4): 241-273.
- Rösch V, Tscharnkte T, Scherber C and Batary P (2013) Landscape composition, connectivity and fragment size drive effects of grassland fragmentation on insect communities. *Journal of Applied Ecology* 50(2): 387-394.
- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D and Legal L (2007) ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43(1): 240-250.
- Rufas JS, Esponda P, Gosálvez J (1985) NOR and nucleolus in the spermatogenesis of acridoid grasshoppers. *Genetica* 66: 139-144.
- Ruiz-Estevez M, Lopez-Leon MD, Cabrero J and Camacho JPM (2012) B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS One* 7(5): e36600.
- Saha D, Ranjan SK, Mallick CB, Vidyarthi AS and Ramani R (2011) Genetic diversity in lac resin-secreting insects belonging to *Kerria* spp., as revealed through ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 39(2): 112-120.
- Santos JL and Fox DP (1988) A study of nucleolus organiser regions (NORs) in the subfamily gomphocerinae (Acrididae; Orthoptera) by means of an acridine orange staining procedure. *Genet (Life Sci Adv)* 7: 27-32.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6): 365-371.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Schmid-Hempel R, Eckhardt M, Goulson D, Heinzmann D, Lange C, Plischuk S, ... and Schmid-Hempel P (2014) The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *Journal of Animal Ecology* 83(4): 823-837.
- Schutze MK, Krosch MN, Armstrong KF, Chapman TA, Englezou A, Chomič A, ... and Clarke AR (2012). Population structure of *Bactrocera dorsalis* ss, *B. papayae* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypothesis using mitochondrial DNA and wing-shape data. *BMC Evolutionary Biology* 12(1): 130.

- Sekar S and Karanth P (2013) Flying between sky islands: the effect of naturally fragmented habitat on butterfly population structure. *PloS one* 8(8): e71573.
- Semagn K, Bjørnstad Å and Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Sesarini C and Remis MI (2008) Molecular and morphometric variation in chromosomally differentiated populations of the grasshopper *Sinipta dalmani* (Orthoptera: Acrididae). *Genetica* 133(3): 295-306.
- Shaw MW and Hewitt GM (1985) The genetic control of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 54(2): 187-194.
- Shouhani H, Dousti A, Radjabi R and Zarei M (2014) Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *Journal of BioScience and Biotechnology* 3(2).
- Silva-Neto LC, Bernardino AC, Loreto V and Moura RC (2015) Physical mapping of 18S and 5S rDNA loci and histone H3 gene in grasshopper species of the subfamily Gomphocerinae (Acrididae). *Genetics and molecular research* 14(4): 15008-15015.
- Song H (2010) Grasshopper systematics: past, present and future. *J Orthoptera Res* 19: 57–68.
- Song H, Amédégnato C, Cigliano MM, Desutter-Grandcolas L, Heads SW, Huang Y, Otte D and Whiting MF (2015) 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics* 31: 621–651.
- Souza MJ and Kido LMH (1995) Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). *Rev Brasil Genet* 18: 517–520.
- Souza MJ and Melo NF (2007) Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera; Acrididae; Cyrtacanthacridinae): Karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region (NORs). *Genetics and Molecular Biology* 30(1): 54-59.
- Souza MJ and Moura RC (1999) Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera, Proscopiidae). *Cytobios* 101: 137–144.
- Souza MJ, Rufas JS and Orellana J (1998) Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Orthoptera; Romaleidae). *Caryologia* 51: 73-80.
- Souza MJ, Haver PR and Melo NF (2003) Karyotype, C and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae). *Caryologia* 56(3): 261-267.
- Souza TE, Oliveira DL, Santos, JF and Rieger TT (2014) Physical mapping of the Period gene on meiotic chromosomes of South American grasshoppers (Acridomorpha, Orthoptera). *Genetics and Molecular Research* 13(4): 10829-10836.
- Souza TE, Silva-Neto LC, Santos JF, Loreto V and Rieger TT (2015) A small B chromosome in the grasshopper *Ommexecha virens* (Ommexechidae) *Genetic and Molecular Research* 14(4): 17505 – 17510.
- Sun W, Dong H, Gao YB, Su QF, Qian HT, Bai HY, ... and Cong B. (2015) Genetic Variation and Geographic Differentiation Among Populations of the Nonmigratory Agricultural Pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. *Journal of Insect Science* 15(1): 150.

- Swift TL and Hannon SJ (2010) Critical thresholds associated with habitat loss: a review of the concepts, evidence, and applications. *Biological Reviews* 85(1): 35-53.
- Teneva A (2009) Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25(5-6): 1267-1284.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F and Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*, 119(2): 217-225.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Acosta MJ, Sánchez A and Camacho JPM (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research* 125(4): 286-291.
- Timakov B, Liu X, Turgut I and Zhang P (2002) Timing and targeting of P-element local transposition in the male germ line cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160: 1011–1022.
- Toews DP and Brelsford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21(16): 3907-3930.
- Valadkhan S (2005) snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Curr Opin Chem Biol* 9: 603–608.
- Vandergast AG, Lewallen EA, Deas J, Bohonak AJ, Weissman DB and Fisher RN (2009) Loss of genetic connectivity and diversity in urban microreserves in a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmidae: *Stenopelmatus n. sp.* “santa monica”). *Journal of Insect Conservation* 13(3): 329-345.
- Velu D, Ponnuvel KM, Muthulakshmi M, Sinha RK, Qadri SM (2008) Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains of *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *J Genet Genomics* 35(5): 291-297.
- Vieira J, Vieira CP, Hartl DL and Lozovskaya ER (1997) A framework physical map of *Drosophila virilis* based on P1 clones: applications in genome evolution. *Chromosoma* 106: 99-107.
- Vijayan K (2005) Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. *International Journal of Industrial Entomology* 10(2): 79-86.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, ... and Urs S R (2006) Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6(1): 30.
- Viseras E, Cabrero J, Talavera M and Camacho JPM (1991) C-banding and NOR location variations in oedipodine grasshoppers. *Cytobios* 68: 165-177.
- Wan QH, Wu H, Fujihara T and Fang SG (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 2165–2176.
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. 3rd Edition Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson GM (2015) Lack of population genetic structure in the bat fly (*Trichobius major*) in Kansas, Oklahoma, and Texas based on DNA sequence data for the cytochrome oxidase I (COI) and NADH dehydrogenase 4 (ND4) genes. In *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 87: 31-36.
- Wolfe AD (2005) ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Methods in Enzymology* 395: 134-144.

- Wolfe AD and Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS and Doyle JJ (eds) Plant Molecular Systematics II. Kluwer, Boston, pp 43-86.
- Wolfe AD, Xiang QY and Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7(9): 1107-1125.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, et al. (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genet* 7(8): e1002203.
- Zhang DX and Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 247–251.
- Zhang DX and Hewitt GM (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology* 6: 143–150.
- Zhang XD and Matunis MJ (2005) Ubi in charge: Regulating E2 enzyme nuclear import. *Nature Cell Biology* 7(1): 12-14.
- Zhao L and Jones WA (2012) Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *ISJ* 9: 93 – 101.
- Zheng X, Hu J, Kunnon SP and Xiaoguang C (2010) Identification of necrophagous fly species from 12 different cities in China using ISSR and SCAR markers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(7): 510-514.
- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zou Z, Gui Z, Yu L, Chen F and Xia B (2011) Genetic diversity within and among populations of *Acarus siro* L. revealed by inter simple sequence repeats (ISSR). *Procedia Environmental Sciences* 8: 707-714.

10. Anexos

Anexo 1

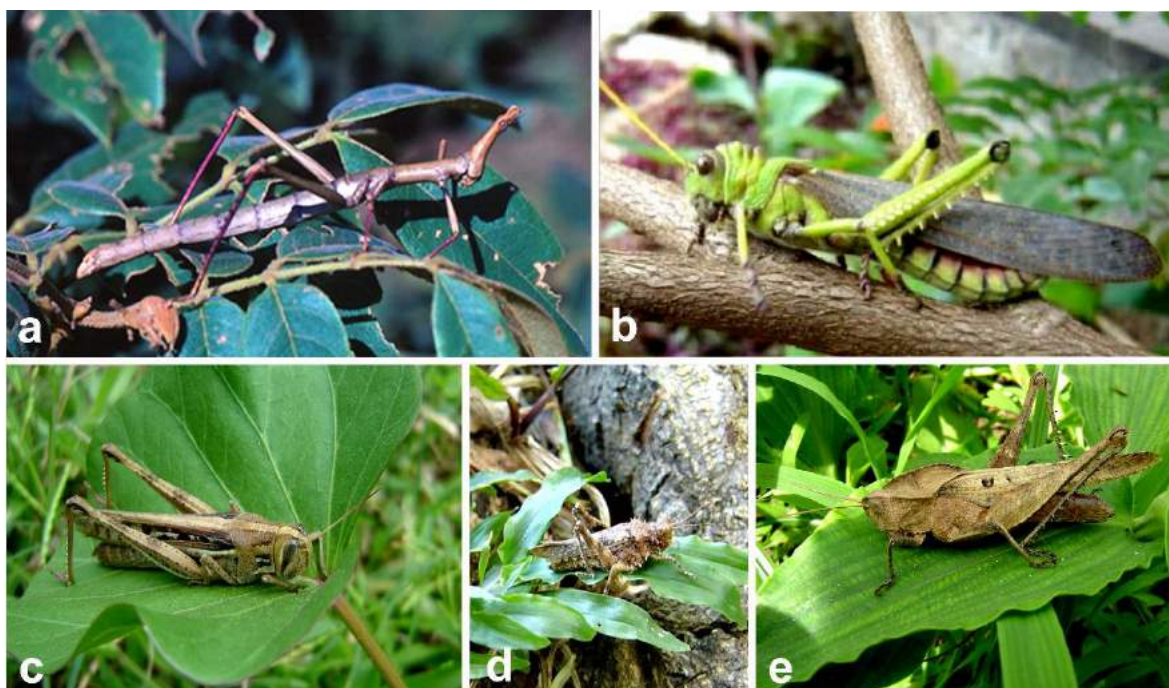


Figura suplementar 1. Exemplos fêmeas das espécies de gafanhotos utilizadas neste estudo. a) *Stiphra robusta*; b) *Tropidacris collaris*; c) *Schistocerca pallens*; d) *Ommexecha virens*; e) *Xyleus discoideus angulatus*. Créditos: (a): Eades et al., Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. 02/03/2016. 21h30min. (b, c, d, e): Campos, SRC; 2005.

Anexo 2

1. Extração de DNA genômico de gafanhotos (Aljanabi e Martinez, 1997)

Materiais:

1. Tampão de lise (EDTA 0,5M + NaCl 5M+ Tris-HCl 1M);
2. SDS 10%;
3. NaCl 5M;
4. proteínase K;
5. isopropanol absoluto;
6. Etanol 70%;
7. Tubos 1,5 ml;
8. Pinças e tesoura;
9. Água de injeção, deionizada ou Tampão TE (EDTA 0,5M + Tris-HCl 1M).

Procedimentos:

1. Com o auxílio de uma tesoura bem afiada, cortar a pata saltatória do gafanhoto na altura do trocanter. De posse da pata, ainda com a tesoura, fazer um corte entre o trocanter e o fêmur de modo a expor o músculo no interior da estrutura do fêmur;
2. Com o auxílio de pinça, pressiona-se cuidadosamente o fêmur para expor completamente o músculo de pata. A pata será colocada numa solução de extração que será preparada no passo seguinte;
3. Em um tubo eppendorf adicionar: 400µL de Tampão de Lise + 7µL de proteínase K (10mg/mL) + 72µL de SDS a 10%;
4. Pronta a solução de extração, coloca-se o músculo da pata;
5. Com o auxílio de um bastão macerar o material até obter fragmentos de difícil visualização e incubar no banho-maria por um período entre 2 a 8 horas a 60°C;
6. Retirar o material do banho-maria e adicionar 420µL de NaCl 5M e “vortexar” por 1 minuto;
7. Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos;
8. Transferir o sobrenadante para outro tubo eppendorf com capacidade de 2 ml. Nesta etapa o pellet é descartado. Adicionar um volume de isopropanol absoluto (800µL) e homogeneizar manualmente;
9. Incubar a -20°C por 1h;
10. Retirar o tubo ainda congelado e centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos;
11. Descartar o sobrenadante, secar o tubo invertendo-o e deixando-o escorrer por um tempo em papel toalha. Lavar o pellet com etanol a 70% (500µL) gelado, “vortexar” e centrifugar por 10 minutos;
12. Descartar o sobrenadante, secar (em liofilizador ou como no passo 11) e ressuspender em 300µL de TE ou água deionizada. Guardar a -20°C.

2. Hibridização *In Situ* Permanente (PISH) (Rieger, 2007) com modificações do autor

1ª Etapa: Tratamento das lâminas

1. Fixar as lâminas em solução etanol absoluto e ácido acético absoluto (3:1) por 15 min
2. Coloca-las em ácido acético (60%) por 5-10 min para dispersar o citoplasma
3. Desnatura-las em NaOH 0,14M/etanol 70% (0,56g de NaOH em 100ml de etanol 70%) por 2-4 min
4. Lava-las rapidamente em 2X SSC (solução citrato salina)
5. Lavar em 2X SSC por 10 min
6. Desidratar 2 vezes em etanol 70% e 2 vezes em etanol absoluto (5 min cada)
7. Deixar secar

2ª Etapa: Marcação da sonda

1. Utilizando kit Nick Translation System GibcoBRL®:

X µl de água ultra pura

5 µl de dNTPs

Y µl de DNA genômico*

5 µl de enzima

45 µl

*volume apropriado para uma concentração de 150 ng de DNA genômico por lâmina

2. “Vortexar” rapidamente e centrifugar a mistura de hibridização por no máximo 10s
3. Incubar por 3 horas a 15-18°C
4. Interromper a reação com *Stop-buffer*
5. Adicionar 1µl de SDS 5%
6. Adicionar 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M
7. Adicionar 2,5 vezes o volume total de acetato de etanol absoluto a -20°C
8. Precipitar overnight a 4°C
9. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min
10. Descartar o sobrenadante e deixar o tubo secar a 25°C
11. Ressuspender o DNA marcado com volume de água ultra pura desejada.

3ª Etapa: Desnaturação da sonda

1. Colocar o mix (mistura) de hibridização (65% de estringência) no termociclador a 94°C por 10 min.

Xµl de tampão de hibridização

Yµl de formamida (concentração final 15%)

Z µl de DNA genômico marcado (150 ng de DNA genômico por lâmina)

Volume para 15 µl de mix por lâmina

2. Colocar em banho de gelo por 3 min
3. Aplicar 15 µl por lâmina (150 ng de sonda por lâmina)
4. Cobrir com lamínula
5. Incubar as lâminas em câmara úmida a 37°C por 36 hs

Intervalo entre a 3ª e 4ª etapa

1. Colocar a 37°C uma cubeta com 2X SSC e um béquer com 95 ml de Tampão 1
2. Verificar se há quantidade suficiente de Tampão I, Tampão III e 2X SSC

4ª etapa: Revelação da sonda por NBT/BCIP

1. Pesar 5g de leite desnatado Molico® e misturar nos 95 ml de Tampão I (Tris 0,1M; NaCl 0,15M; pH 7,5), devolvendo para a estufa 37°C
2. Retirar as lâminas da câmara úmida e lavar em 2X SSC a TA para desprender a lamínula
3. Lavar em 2X SSC por 10 min
4. Lavar em 2X SSC 37°C por 30 min
5. Lavar em 2X SSC por 30 min
6. Lavar em Molico® 5% em Tampão I por 30 min
7. Lavar rapidamente em Tampão I
8. Adicionar o conjugado streptavidina-fosfatase alcalina (GibcoBRL®) sobre a lâmina (1-2µl em 1ml de Tampão I). Não deixar secar.
9. Lavar rapidamente em Tampão I
10. Lavar 2 vezes em Tampão I por 10 min cada
11. Lavar em Tampão III (Tris 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 0,05M; pH 9,5) por 10 min
12. Em um tip: 1 ml de tampão III + 4,4µl NBT + 3,3µl BCIP (GibcoBRL®)
13. Aplicar sobre as lâminas e cobrir com lamínulas
14. Deixar em escuro absoluto por 3 horas
15. Lavar as lâminas em água destilada e deixar secar ao ar
16. Corar com solução corante para PISH por ± 2min
17. Selar com Entellan® (1 gota pequena) e lamínula. Colocar um “pesinho” para auxiliar
18. Analisar em microscópio no dia seguinte

Observações:

1. Tampão de hibridização sem formamida:

500 µl de SSC 20X

1000 µl de sulfato de dextran 50%

200 µl de DNA de esperma de salmão (10mg/ml)

1800 µl de água ultra pura

3500 µl de tampão de hibridização para uso. Estocar a -20°C

2. Solução corante para PISH

4,5 ml de ácido acético absoluto
2 ml de orceína lacto-acética 1%
3,5 ml de água ultra pura
Armazenar em vidro escuro a 4°C

3. Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) (Moscone *et al.*, 1996)

1ª Etapa: Tratamento das lâminas

1. Série alcoólica:

Fixar as Lâminas em solução etanol e ácido acético absolutos (3:1) por 15 minutos

Desidratar em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%

2. RNase:

Incubar as lâminas com 50 µL de solução de RNase, cubra com lamínula, por 1h a 37°C em câmara úmida pré-aquecida

Solução estoque de RNase (4°C): 20 mg/mL de RNase (Invitrogen)

Solução de RNase para uso: 100 µg/mL em 2X SSC (diluição 1:200)

Lavar as lâminas 3 vezes por 5 min em 2X SSC

3. Pepsina:

Incubar as lâminas com 50 µL de solução de pepsina, cubra com lamínula por 20 min a 37°C em câmara úmida pré-aquecida

Solução estoque de pepsina (20°C): 1 mg/mL em H₂O miliQ

Solução de pepsina para uso: 10 µg/mL em 0,01 N HCl (diluição 1:100)

4. Lavar as lâminas 2 vezes por 5 min em 2X SSC

5. Colocar as lâminas no PBD + formaldeído (formol) 37% por 10 min;

6. Lavar as lâminas 2 vezes por 5 min em 2X SSC*;

7. Série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%;

8. Colocar as lâminas na estufa a 37°C até secar (10-15 min);

9. Preparar o mix de sonda*.

*fazer o Mix de Hibridização após a passagem pelo formol (formaldeído) + PBD

2ª Etapa: Hibridização

1. Mistura (Mix) de hibridização (76% de estringência):

Quantidade Reagentes para 10 µL	Concentração inicial	Concentração final
5 µL Formamida	100%	50%
2 µL Sulfato Dextran 50%	50%	10%

1 µL 20 x SSC	20 x SSC	2 x SSC
2 µL de sonda (quando precipitada)	200-250ng	20-25ng

2. Fazer mix multiplicando todos os componentes pelo número de lâminas.
3. “Vortexar” a mistura de hibridização por no mínimo 10 s
4. Aqueça a mistura de hibridização a 95°C por 10 min (em termociclador) e transfira para o gelo (ou freezer) por pelo menos 5 min
5. Centrifugar por 10 segundos e coloque 10 µL da mistura de hibridização por lâmina, cubra com lamínula de vidro (24x24mm ou 24x32mm)
6. Desnaturar o material nas lâminas a 75°C por 5 min (temperatura e tempo adequáveis [leve a câmara úmida ao banho-maria]).
7. Vedar com cola plástica e incube em câmara úmida pré-aquecida a 37°C de 18 a 72 horas.

3ª Etapa: Banhos pós-hibridização

1. Retire a cola plástica com a pinça e mergulhe as lâminas em 2X SSC a 25°C, até desprenderem as lamínulas das lâminas.

Lavagem convencional (72% de Estringência):

2. Incube 2 vezes em 2X SSC, 42°C, por 5 min
3. Incube 2 vezes em 0,1X SSC, 42°C, por 5 min
4. Incube em 2X SSC, 42°C, por 5 min
5. Transfira para 2X SSC, 25°C, por 10 min
6. Transfira para o PBD a 45°C até preparar o anticorpo.

4ª Etapa: Detecção (para sondas marcadas indiretamente)

Anticorpos primários:

Solução com anticorpos (diluir em PBD)	lamínula 24x32mm	lamínula 24x50mm
Avidin-FITC®	0,15 µL	0,3 µL
Anti-Digoxigenin-Rhodamine®	0,25 µL	0,5 µL
PBD	Completa para 50 µL por lâmina	Completa para 100 µL por lâmina

1. Aplique 50-100 µL da solução de anticorpo por lâmina, cubra com lamínula e incube a 37°C em câmara úmida por 30-45 min
2. Remova a lamínula e lave 3 vezes em PBD, 5 min cada.

Anticorpos secundários:

1 µL de Anti-Avidina biotinilada
29 µL de PBD
30 µL por lâmina

1. Fazer mix multiplicando todos os componentes pelo número de lâminas.
2. Aplique 30 µL de anticorpo secundário, cubra com lamínula e incube a 37°C em câmara úmida por 10 min
3. Remova a lamínula e lave 2 vezes em PBD, 2 min cada

Terceira rodada de “anticorpos”

0,15 µL de Anti-Avidina biotinilada	0,3 µL de Anti-Avidina biotinilada
49,85 µL de PBD	99,7 µL de PBD
50 µL por lâmina	100 µL por lâmina

1. Aplique 50-100 µL da solução de anticorpo por lâmina, cubra com lamínula e incube a 37 °C em câmara úmida por 30-45 min.
2. Aplicar 20 µL de DAPI, cobrir com lamínula e deixar por 10-15 min.
3. Remover parafilme ou lamínula, aplicar de 12-15 µL de Vectashield®, cobrir com lamínula 24x32mm e selar com tinta de esmalte.

5ª Etapa: Re-hibridização de lâminas (se necessário)

1. Remova o esmalte e lave a lâmina em 4x SSC/0,1% Tween20® até desprender a lamínula
2. Lave a lâmina 3 x 30 min a 1 h em 4x SSC/0,1% Tween20®
3. Lave as lâminas 2 x 5 min em 2x SSC
4. Desidrate em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 96%
5. Seque as lâminas por pelo menos 1 hora (no mínimo 30 min)
6. Continue a partir da 2ª etapa - **Hibridização**.

Observações:

1. Avidin-FITC® irá detectar sondas contendo Biotina; Anti-Digoxigenin-Rhodamine® irá detectar sondas marcadas com digoxigenina; em caso de duplo-FISH; a Avidina não é um anticorpo, é uma molécula que possui alta afinidade pela biotina, formando um conjugado. Fazer mix multiplicando todos os componentes pelo número de lâminas.
2. Solução PBD (400 ml)
 - 4g de leite desnatado Molico®
 - 80 ml de 20 x SSC
 - 2 ml (2000 µL) de Tween20® ou Triton®
 - Completar para 400 ml com água destilada

3. Solução formol + PBD (40 ml)
1g de leite desnatado Molico®
4mL de formaldeído (formol) 37%
0,8 ml (800 µL) de 20 x SSC
0,04 ml (40 µL) de Tween20® ou Triton®
Completar para 40 ml com água destilada
4. A quantidade final do mix poderá variar dependendo da quantidade de sonda (duplo-FISH) utilizada ou volume de mix aplicado por lâmina (usar regra-de-três para outros volumes).

4. Procedimentos para os marcadores ISSR (*Inter-simple sequence repeat*) (Wolfe, 2005)

1ª Etapa: volume de PCR (10µL):

1. 4,9 µL de água ultra pura;
2. 1 µL de MgCl₂ (2,5 mM);
3. 1 µL de dNTPs (2 mM);
4. 1 µL de *Buffer*+KCl (10X);
5. 1 µL de primer (10 pmol);
6. 0,1 µL de *Taq* DNA Polimerase Fermentas®;
7. 1 µL de DNA genômico (10 ng).

2ª Etapa: programação do termociclador

1. Ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 4 min;
2. 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s;
3. Anelamento do *primer* a 52°-54°C por 45s;
4. Extensão a 72°C por 2 min;
5. Extensão final a 72°C por 7 min.

2ª Etapa: condições da corrida de eletroforese em tampão TBE 1X (Tris; ácido bórico; EDTA 0,5M)

1. Concentração do gel de agarose em tampão TBE 1X: 1,8%
2. Tempo da corrida de eletroforese: 5 horas
3. Voltagem: 80V
4. Potência: 90W
5. Amperagem: 100mA

Referências Bibliográficas

- Aljanabi SM and Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22): 4692-4693.
- Moscone EA, Matzke MA and Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236.
- Rieger TT, Oliveira-Silva SV, Pacheco IA, Chagas BS and Santos JF (2007) Localization of HSP single-copy genes by inexpensive, permanent non-fluorescent in situ hybridization on meiotic chromosomes of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Acrididae). *Genetics and Molecular Research* 6(3): 643-649.
- Wolfe AD (2005) ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Methods in enzymology* 395: 134-14.

Anexo 3

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

Life Sciences | Genetica – incl. option to publish open access



www.springer.com

Life Sciences Home > Life Sciences

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Genetica

An International Journal of Genetics and Evolution

Co-Editor-in-Chief: P. Capy; R. C. Woodruff

ISSN: 0016-6707 (print version)

ISSN: 1573-6857 (electronic version)

Journal no. 10709

**\$199.00** Personal Rate e-only for the Americas

Online subscription, valid for one calendar year

Immediate Content Access via SpringerLink

1 Volumes with 6 issues per year

Subscription will auto-renew for another year unless duly terminated

FAQ & Policy

ABOUT THIS JOURNAL EDITORIAL BOARD SPECIAL ISSUES - RECENTLY PUBLISHED
ETHICS AND DISCLOSURES INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

http://www.springer.com/life+sciences/journal/10709?print_view=true&detailsPage=pltdi_1060689

1/15

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- # Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- # Use italics for emphasis.
- # Use the automatic page numbering function to number the pages.
- # Do not use field functions.
- # Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- # Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- # Use the equation editor or MathType for equations.
- # Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).
Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.
Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

CONFLICT OF INTEREST

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

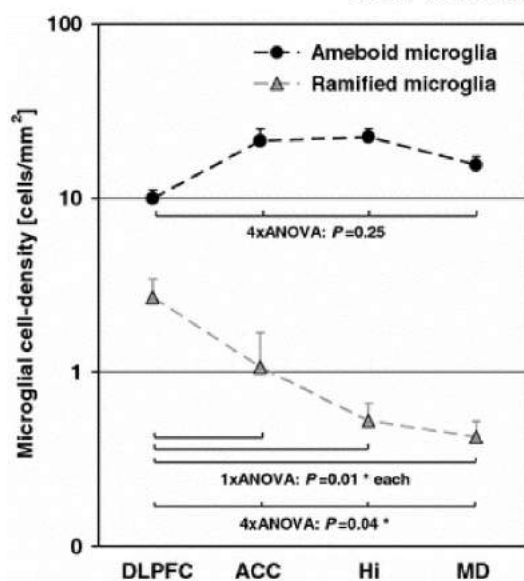
- # All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- # Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- # For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- # Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- # Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- # Supply all figures electronically.
- # Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- # For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- # Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



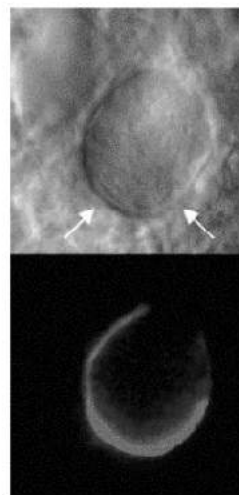
- # Definition: Black and white graphic with no shading.
- # Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- # All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- # Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

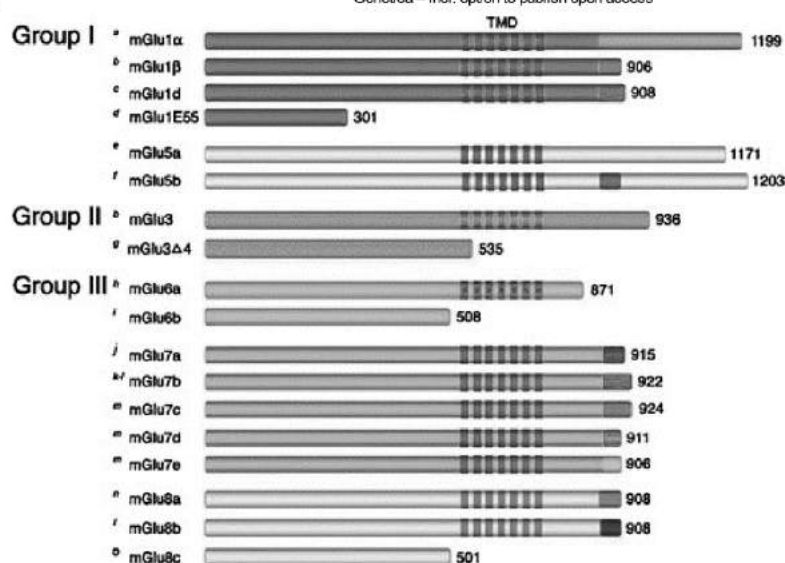
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- # To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- # Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- # Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- # Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- # Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures.

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ⌘ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ⌘ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ⌘ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ⌘ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ⌘ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas
Springer
publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务, 使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容, 通过对学术内容的判断来决定文章的取舍, 而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司, 协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

- ⊞ The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- ⊞ The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- ⊞ A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- ⊞ No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- ⊞ No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- ⊞ Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- ⊞ Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- ⌘ Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- ⌘ Honoraria for speaking at symposia
- ⌘ Financial support for attending symposia
- ⌘ Financial support for educational programs
- ⌘ Employment or consultation
- ⌘ Support from a project sponsor
- ⌘ Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- ⌘ Multiple affiliations
- ⌘ Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- ⌘ Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- ⌘ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

"For this type of study formal consent is not required."

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted."

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

"This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

"Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Springer Open Choice

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

[View Open Access Articles](#)

[Online First Articles](#)

[All volumes & issues](#)

FOR AUTHORS AND EDITORS

2014 Impact Factor

1.400

[Aims and Scope](#)

[Submit Online](#)

[Open Choice - Your Way to Open Access](#)

[Instructions for Authors](#)

[Author Academy: Training for Authors](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

http://www.springer.com/life+sciences/journal/10709?print_view=true&detailsPage=plfci_1060689

14/15

25/01/2016

Genetica – incl. option to publish open access

[Contacts](#)[Download Product Flyer](#)[Order back issues](#)[Article Reprints](#)[Bulk Orders](#)**ALERTS FOR THIS JOURNAL**

Get the table of contents of every new issue published in Genetica.

Your E-Mail Address

☐

Please send me information on new Springer publications in Life Sciences (general).



28/01/2016

Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access

Life Sciences - Entomology | Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access



www.springer.com

Entomology Home > Life Sciences > Entomology

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Journal of Insect Conservation

An international journal devoted to the conservation of insects and related invertebrates

Editor-in-Chief: John **Dover**

ISSN: 1366-638X (print version)

ISSN: 1572-9753 (electronic version)

Journal no. 10841



\$99.00 Personal Rate e-only for the Americas

Online subscription, valid for one calendar year

Immediate Content Access via SpringerLink

1 Volumes with 6 issues per year

Subscription will auto-renew for another year unless duly terminated

[FAQ & Policy](#)

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

http://www.springer.com/life+sciences/entomology/journal/10841?print_view=true&detailsPage=pltc_2095533

1/14

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Additional request

Upon submission, the e-mail addresses of all authors will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Important note:

All authors are requested to use the continuous line numbering function for their manuscripts.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

SCIENTIFIC STYLE

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long

28/01/2016

Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access

author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

- # All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- # Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- # For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- # Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- # Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

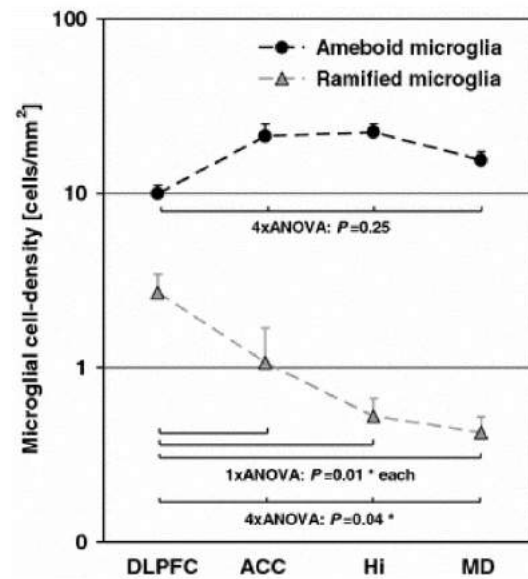
- # Supply all figures electronically.
- # Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- # For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

28/01/2016

Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access

✉ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



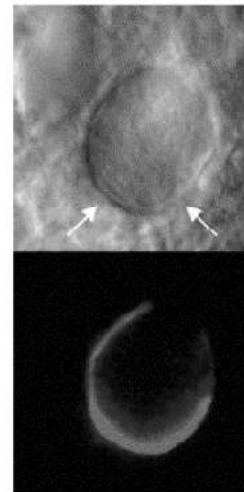
- ✉ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ✉ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ✉ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ✉ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ✉ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

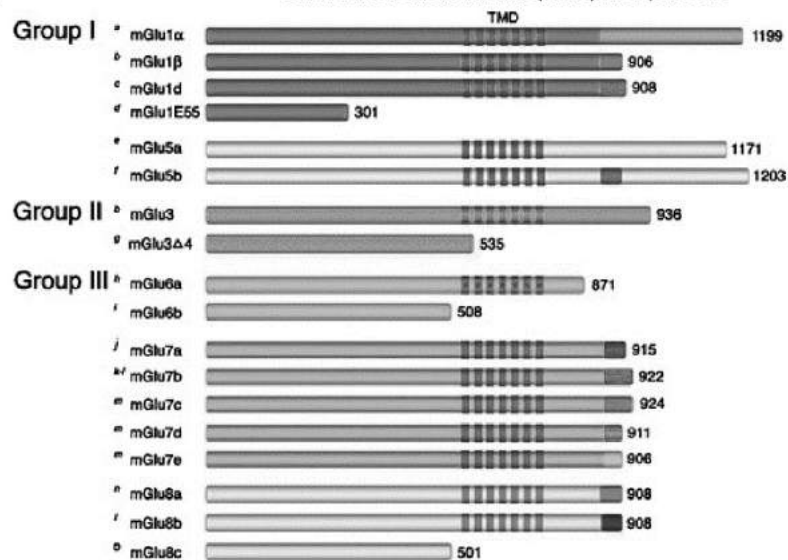
Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- # To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- # Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- # Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- # Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- # Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures.

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ⌘ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ⌘ Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ⌘ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ⌘ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ⌘ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other

problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas
Springer
publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务, 使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容, 通过对学术内容的判断来决定文章的取舍, 而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司, 协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- ⊞ The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- ⊞ The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- ⊞ A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- ⊞ No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- ⊞ No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- ⊞ Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- ⊞ Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- ⌘ Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- ⌘ Honoraria for speaking at symposia
- ⌘ Financial support for attending symposia
- ⌘ Financial support for educational programs
- ⌘ Employment or consultation
- ⌘ Support from a project sponsor
- ⌘ Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- ⌘ Multiple affiliations
- ⌘ Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- ⌘ Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- ⌘ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this

research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

28/01/2016

Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

[View Open Access Articles](#)

[Online First Articles](#)

[All volumes & issues](#)

FOR AUTHORS AND EDITORS

2014 Impact Factor

1.717

[Aims and Scope](#)

[Submit Online](#)

[Open Choice - Your Way to Open Access](#)

[Springer Author Academy](#)

[Instructions for Authors](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

[Contacts](#)

[Download Product Flyer](#)

[Order back issues](#)

[Article Reprints](#)

[Bulk Orders](#)

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in Journal of Insect Conservation.

Your E-Mail Address

http://www.springer.com/life+sciences/entomology/journal/10841?print_view=true&detailsPage=pl/tci_2095533

13/14

28/01/2016

Journal of Insect Conservation - incl. option to publish open access

SUBMIT

☐ Please send me information on new Springer
publications in Entomology.



11. Currículo *Lattes* atualizado (correspondente ao período do curso)

19/02/2016

Currículo *Lattes*Currículo *Lattes*

Imprimir currículo



Tyago Eufrásio de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1718214313211049>

Última atualização do currículo em 02/02/2016

Resumo informado pelo autor

Possui Bacharelado em Ciências Biológicas (2008) e Mestrado em Genética (2012) pela Universidade Federal de Pernambuco. Atualmente é doutorando do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Tyago Eufrásio de Souza

Filiação Genilson Nóbrega de Souza e Arlene Eufrásio de Souza

Nascimento 04/09/1985 - Recife/PE - Brasil

Carteira de Identidade 7104868 sds - PE - 10/07/2002

CPF 055.844.084-33

Endereço residencial Rua Batuíra, Nº 55
Piedade - São Lourenço da Mata
54750-750, PE - Brasil
Telefone: 81 35253208

Endereço profissional Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas
Avenida Moraes Rego, s/n
Cidade Universitária - Recife
PE - Brasil

Endereço eletrônico E-mail para contato: tyago_eufrazio@yahoo.com.br
E-mail alternativo tyagoultar@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Diversidade cromossômica e molecular de gafanhotos neotropicais, com ênfase em *Ommexecha virens*.
Orientador: Dr. a Rita de Cássia de Moura
Co-orientador: Dr. a Tania Tassinari Rogier
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Grasshoppers; Mapeamento cromossômico; Genes de cópia única; Cromossomo B; Diversidade molecular
Áreas do conhecimento: Citogenética Animal/Genética Animal

2010 - 2012 Mestrado em Genética
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Cartografia genômica do gene Period em quatro espécies de gafanhotos neotropicais (Orthoptera: Acridoidea). Ano de obtenção: 2012
Orientador: Tania Tassinari Rogier
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Palavras-chave: Chromosomal homology, Grasshoppers, Permanent in situ hybridization, Evolution
Áreas do conhecimento: Genética Animal

2004 - 2008 Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Hibridização in situ de genes de resposta a estresse nos gafanhotos *Ommexecha virens* (OMMECHECHIDAE) e *Tropidocoris collaris* (ROMALEIDAE)
Orientador: Dra Tania Tassinari Rogier

Áreas de atuação

1. Citogenética Animal

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impv.trata

1/3

19/02/2016

Currículo Lattes

Artigos completos publicados em periódicos

1.  **SOUZA, T. E., SILVA-NETO, L. C., SANTOS, J. F., LORETO, V., RIEGER, T. T.**
Short Communication A small B chromosome in the grasshopper *Ommexecha vires* (Ommexechidae).
Genetics and Molecular Research **14**, v. 14, p.17505 - 17510, 2015.
Referências adicionais - Português: *Meio de divulgação*: *Meio digital* *Home page*:
doi:10.4238/2015.december.21.22
2.  **SOUZA, T. E., OLIVEIRA, D. L., SANTOS, J. F., RIEGER, T. T.**
Physical mapping of the Period gene on meiotic chromosomes of South American grasshoppers.
(Acridomorpha, Orthoptera). *Genetics and Molecular Research* **13**, v. 13, p.10829 - 10836, 2014.
Referências adicionais - Português: *Meio de divulgação*: *Meio digital* *Home page*:
doi:10.4238/2014.december.18.47

Apresentação de trabalho e palestra

1. SOUZA, T. E., JUNIOR, M. E. P., LIMA, A. P., SANTOS, J. F., RIEGER, T. T.
Drosophila melanogaster: um modelo de sucesso no ensino de Genética na UFPE, 2012.
(Comunicação Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: *Drosophila*, *Genética*, *Mendeliana*, *mutação*
Áreas do conhecimento: *Genética*
Referências adicionais - *Brasil/Português*: *Meio de divulgação*: *Impresso*: *Local*: *Complexo Multieventos da Univasf*, *Cidade*: *Juazeiro*, *Evento*: *XIX Encontro de Genética do Nordeste*; *Inst.promotora/financiadora*: *Univasf/UFPE*
2. SOUZA, T. E., OLIVEIRA, D. L., SANTOS, J. F., RIEGER, T. T.
Localização física do gene Period (Per) no gafanhoto Stiphra robusta (Orthoptera; Proscopiidae), 2012. (Comunicação Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: *Permanent in situ hybridization*, *Stiphra robusta*, *Homologia cromossômica*
Áreas do conhecimento: *Genética Animal*
Referências adicionais - *Brasil/Português*: *Meio de divulgação*: *Impresso*: *Local*: *Complexo Multieventos da Univasf*, *Cidade*: *Juazeiro*, *Evento*: *XIX Encontro de Genética do Nordeste*; *Inst.promotora/financiadora*: *Univasf/UFPE*

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Pôster no(a) **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)
Chromosomal evolution by single copy genes mapping using permanent non-fluorescent in situ hybridization (PIISH) in five neotropical grasshoppers species (Acridomorpha).
2. Apresentação de Poster / Pôster no(a) **XIX Encontro de Genética do Nordeste**, 2012. (Encontro)
Localização física do gene Period (Per) no gafanhoto *Stiphra robusta* (Orthoptera; Proscopiidae).
3. **IV Curso de Bioinformática: Análise de dados moleculares**, 2012. (Oficina)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. REGUEIRA NETO, M. S., BISPO, A. V. S., SOUZA, T. E.
Participação em banca de Rafael Pereira de Barros. **Uso do marcador ITS2 como ferramenta para identificar traços do parasitóide Cotesia sp. (Hymenoptera; Braconidae) em Diatraea flavipennella (Lepidoptera; Cimbicidae)**, 2015.
(Ciências Biológicas Bacharelado) Universidade Federal de Pernambuco
Referências adicionais - *Brasil/Português*.
2. SANTOS, J. F., RIEGER, T. T., SILVA, V. L., SOUZA, T. E.
Participação em banca de Diego Leandro de Oliveira. **Mapeamento por hibridização in situ permanente dos genes Period e Hsp70 no gafanhoto Stiphra robusta (Orthoptera; Eumastacoidea; Proscopiidae)**, 2013.
(Ciências Biológicas Bacharelado) Universidade Federal de Pernambuco
Referências adicionais - *Brasil/Português*.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	4
Apresentações de trabalhos (Comunicação)	2
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1

Eventos

Participações em eventos (congresso)	3
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	3
Participações em eventos (oficina)	1
Participações em eventos (encontro)	3
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)	3

19/02/2016

Currículo Lattes

Outras informações relevantes

- 1 Realizou estágio voluntário durante o período de 01 de agosto de 2006 a 31 de julho de 2007 e estágio bolsista/Cnpq durante o período de 01 de agosto de 2007 a 31 de julho de 2008 no Laboratório de Citogenética Animal, localizado no Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, durante ambos os períodos e pela PROPESQ-UFPE, no seguinte projeto: GENÉTICA MOLECULAR E MAPEAMENTO POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU DE GÊNES DE RESPOSTA A ESTRESSE EM INSETOS. Atuou como Monitor da Disciplina Introdução à Genética, ministrada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFPE durante o 2º Semestre de 2007 e 1º Semestre de 2008. Atuou como Professor de Biologia em escolas da rede pública e privada nos anos de 2009 e 2010.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 19/02/2016 às 02:50:12.