
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAYS POSTALI

ANÁLISE CROMOSSÔMICA DO GAFANHOTO
Dichromatos montanus COM ÊNFASE NA ANÁLISE
DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS



Rio Claro
2017

LAYS POSTALI

ANÁLISE CROMOSSÔMICA DO GAFANHOTO *Dichromatos montanus* COM ÊNFASE NA
ANÁLISE DE CROMOSSOMOS SEXUAIS

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

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

Rio Claro

2017

591.15 Postali, Lays
P857a Análise cromossômica do gafanhoto *Dichromatos montanus* com ênfase na análise de cromossomos sexuais / Lays Postali. - Rio Claro, 2017
22 f. : il., fots.

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

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

1. Genética animal. 2. Cromossomos neo- XY. 3. Cromossomos sexuais. 4. Gafanhoto. 5. Neo - XY. 6. Heterocromatina. 7. Melanoplinae. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida e pela minha fé que me fez chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Noidemir e Rita e a minha vó Lurdes, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim e pelos valores ensinados e a educação dada para que eu chegasse até aqui e me tornasse a pessoa que sou. À meu namorado Leandro por caminhar ao meu lado e sempre acreditar em mim e me incentivar a estudar e ir em busca dos meus sonhos.

As minhas amigas de faculdade Camila, Cristiane e Giselle pelo companheirismo nesses 5 anos de graduação, por toda força, ajuda e diversão nesses anos de faculdade.

Um agradecimento à todos meus colegas de laboratório, com quem aprendi muito nesses quase 3 anos de convivência, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello, Dra. Vanessa Bardella e Me. Diogo Milani que me ensinaram e me ajudaram em todos os momentos nesta caminhada. Muito obrigada, levarei vocês comigo para sempre!

Agradeço também ao apoio financeiro fornecido pela FAPESP, CNPq e a bolsa de estudos concedida pelo programa PIBIC durante minha iniciação científica junto ao Departamento de Biologia.

E por último, mas não menos importante, à todos os meus professores da graduação, à equipe do Departamento de Biologia e à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Rio Claro. Obrigada por tudo!

RESUMO

Em Orthoptera o sistema de determinação cromossômica sexual $X_0♂/XX♀$ é o mais comum, entretanto já foram descritos outros sistemas sexuais, tais como neo-XY♂/XX♀ e neo- $X_1X_2Y♂/X_1X_1X_2X_2♀$. Estes sistemas foram possivelmente originados por rearranjos cromossômicos como translocações Robertsonianas entre o cromossomo X e um autossomo. Nas quatro espécies pertencentes ao gênero *Dichromatos* foi observado o mecanismo de determinação sexual neo- X_1X_2Y , o qual é derivado dos rearranjos citados anteriormente. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi analisar os cromossomos da espécie *Dichromatos montanus* através de técnicas da citogenética clássica e FISH para compreender a evolução e composição do sistema sexual múltiplo na espécie, bem como dentro do gênero. As regiões heterocromáticas foram restritas as regiões pericentroméricas e ricas em G+C somente em um bivalente. Entretanto, não foram detectadas regiões C- positivas no cromossomo Y, e usando a fração C₀t como sonda não foi observada a presença de DNA alto ou moderadamente repetitivo neste cromossomo. As regiões teloméricas foram presentes no termino de todos os autossomos e apenas nas extremidades dos cromossomos neo-sexuais não envolvidos no rearranjo. Sinais de hibridização com a sonda H3 foram obtidas em apenas um bivalente, seguindo assim, o padrão conservado observado em Acrididae. Já os clusters de 18S rDNA foram detectados no par 6 e no neo- X_1 . Assim, a similaridade nos dados aqui obtidos entre *D. montanus* e *D. schrottkyi* sugerem uma evolução cromossômica correlacionada entre essas espécies. Além disso, essas espécies apresentaram uma divergência cromossômica com base nos marcadores analisados em comparação com *D. lilloanus*.

Palavras-chave: cromossomos sexuais, gafanhoto, neo-XY, heterocromatina, Melanoplinae, DNA repetitivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Ordem Orthoptera.....	5
1.2 Família Acrididae e os Melanoplinae.....	5
1.3 Sistema sexual em Orthoptera.....	6
1.4 Sistema sexual derivado neo – XY.....	6
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos e metas.....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Material biológico e pontos de coleta.....	10
3.2 Preparo das lâminas, coloração convencional e bandeamento-C e CMA ₃ /DAPI... 10	10
3.3.Extração de DNA, isolamento de famílias multigênicas e telômeros.....	10
3.4 Obtenção da fração C ₀ t.....	11
3.5 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	11
4 RESULTADOS.....	12
5 DISCUSSÃO.....	13
6 CONCLUSÕES.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
FIGURAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ordem Orthoptera

A ordem Orthoptera teve origem há 300 milhões de anos (HEWITT, 1979) e atualmente soma mais de 25.000 espécies distribuídas mundialmente, tendo como características principais a capacidade de salto e seus aparelhos estridulatórios (CIGLIANO e LANGE, 1998; POCCO et al., 2010). Esta ordem possui duas subordens principais: Caelifera e Ensifera. A subordem Caelifera inclui as superfamílias: Acridoidea, que exibe 10.000 espécies, sendo essas gafanhotos e bichos pau, os quais são caracterizados pelas antenas curtas; Tetrigoidea com aproximadamente 1.000 espécies; e Trydactiloides, com 146 espécies. A subordem Ensifera é representada pelos ortópteros de antenas longas e constituído pelas superfamílias Gylloidea, Gryllacridoidea, Gryllotalpoidea e Tettigonioidea somando um total de 9.500 espécies descritas (HEWITT, 1979; CIGLIANO e LANGE, 1998).

1.2 Família Acrididae e os Melanoplinae

A superfamília Acridoidea é composta pelas famílias Acrididae, Ommexechidae, Romaleidae, Tristiridae, Pyrgimorphidae, Pyrgacrididae, Pamphagidae, Lathiceridae, Dericorythidae, Lithidiidae e Lentulidae, apresentando a grande maioria dos representantes distribuídos na região Neotropical (HEWITT, 1979; CIGLIANO e LANGE, 1998). Acrididae é a família com maior diversidade, além disso, a subfamília Melanoplinae é caracterizada também pelos acridídeos do Novo Mundo. Essa subfamília contém 43 gêneros e 232 espécies descritas com ampla distribuição geográfica, abrangendo desde o Alasca até o Chile e Argentina (CIGLIANO, 2007; CIGLIANO e LANGE, 2007). A família Melanoplinae ainda é o grupo com maior número de espécies e indivíduos nos estudos de ortópteros na região Neotropical. Muitos desses insetos exibem importância agrícola por serem pragas em diversas lavouras na América (CIGLIANO, 2007). Dentre as espécies que ocorrem na América do Sul estão os representantes do gênero *Dichromatos* (*D. curupa*, *D. lilloanus*, *D. montanus* e *D. schrottkyi*) que estão melhor representadas no estado do Paraná, no sul do Brasil, leste do Paraguai e noroeste da Argentina (CIGLIANO, 1997; CIGLIANO e LANGE, 2007).

1.3 Sistema sexual em Orthoptera

O sistema sexual mais comum em Orthoptera é o $X0^{\text{♂}}/XX^{\text{♀}}$ que é evolutivamente conservado quando comparado com os mecanismos de determinação sexual presentes em outras ordens, como Coleoptera, Diptera e Lepidoptera que apresentam diferentes rearranjos cromossômicos e geração frequente de mecanismos sexuais derivados (WHITE, 1973; HEWITT, 1979; CHARLESWORTH, 1996; YOSHIDO et al., 2013; NGUYEN et al., 2013). Esse mecanismo sexual sugere que os genes presentes no cromossomo X controlam o desenvolvimento do sexo feminino, enquanto que os genes presentes nos autossomos controlam o desenvolvimento do sexo masculino, entretanto esta hipótese necessita de avaliações mais precisas (CHARLESWORTH, 1996; AYLING e GRIFFIN, 2002).

Em indivíduos do sexo masculino de grilos, tetigonídeos e gafanhotos, o cromossomo X é um elemento único não pareado, apresentando geralmente heteropicnose em toda sua extensão durante a divisão meiótica (WHITE, 1973; HEWITT, 1979). A ocorrência da heteropicnose do cromossomo X em Orthoptera indica uma condição genética inerte, também demonstrada devido aos baixos níveis de acetilação de histonas, sendo uma modificação pós-translacional associada com silenciamento genético (CABRERO et al., 2007). Seria esperado portanto, que o cromossomo X carregasse um pequeno número de genes ou regiões determinantes do sexo intercaladas em toda sua extensão, porém até o momento, ainda não se sabe se esse cromossomo X apresenta genes que determinam o sexo ou genes relacionados com a fertilidade dos indivíduos (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013).

1.4 Sistema sexual derivado neo – XY

De acordo com estudos moleculares e citológicos realizados em vários grupos de plantas e animais, as principais etapas durante a evolução dos cromossomos sexuais se mostraram relacionadas ao estabelecimento de genes que determinam o sexo, supressão da recombinação, perda de genes, aumento considerável da quantidade de elementos repetitivos, amplificação da heterocromatina em regiões que não são recombinantes e vários rearranjos estruturais no cromossomo Y ou W (RICE, 1996; CHARLESWORTH et al., 1994, CHARLESWORTH et al., 2005; SKALESTKY et al., 2003; STEINEMANN e STEINEMANN, 2005; HOBZA et al., 2007; KEJNOVSKY et al., 2009; MATSUNAGA, 2009).

Muitos estudos sugerem que os cromossomos sexuais neo-XY foram possivelmente originados por rearranjos cromossômicos como fusões cêntricas ou translocações Robertsonianas (Rb) entre o cromossomo X e um autossomo, sendo modelos experimentais ideais para se estudar os processos envolvidos na degeneração do cromossomo Y (CHARLESWORTH et al., 2005; VELTSOS et al., 2008; CASTILLO et al., 2010b).

Embora o sistema sexual X0 seja bastante frequente em Orthoptera várias espécies com sistemas sexuais derivados de diferentes tipos, tal como neo-XY♂/XX♀ e neo-X₁X₂Y♂/X₁X₁X₂X₂♀, além do sistema mais comum X0♂/XX♀ foram observadas (WHITE, 1973; JOHN e FREEMAN, 1976; HEWITT, 1979; MESA et al., 1982; MESA et al., 2001, MESA et al., 2002; BIDAU E MARTÍ, 2001; VELTSOS et al., 2008, VELTSOS, 2009; CASTILLO et al., 2010a; CASTILLO et al., 2010b, FERREIRA e MESA, 2010). O surgimento de sistemas sexuais derivados no grupo é bastante frequente em representantes da subfamília Melanoplinae (CASTILLO et al., 2010a; CASTILLO et al., 2010b). Dentre estes ganhanhos já foram descritos os sistemas cromossômicos sexuais neo-XY para algumas espécies Sul-Americanas, como por exemplo *Dichroplus silveiraguidoi* (CARDOSO et al., 1974; SÁEZ e PÉREZ-MOSQUERA, 1977), *D. maculipennis*, *D. vittigerum*, *Zygoclistron nasicum*, *Z. falconicum*, *Z. trachysticum* (MESA et al., 2001) e em espécies do gênero *Ronderosia* (CASTILLO et al., 2010a). Adicionalmente sistemas sexuais do tipo neo-X₁X₂Y foram observados por exemplo nos representantes de *Dichromatos* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). A nomenclatura para a diferenciação dos braços cromossômicos nos neo-cromossomos sexuais XY foi proposta por White (1973). Nesta terminologia o neo-X metacêntrico é derivado dos braços XL (*late*, antigo) e XR (*recente*, recente), onde o XL corresponde ao cromossomo X do antigo sistema sexual X0 e o XR é o resultado da fusão do autossomo. Desta forma, o cromossomo homólogo ao braço XR passou a ser denominado como neo-Y, apresentando uma morfologia acro-telocêntrica e restrito a linhagem masculina (WHITE, 1973; HEWITT, 1979).

Há uma possibilidade de que alelos antagônicos sexuais se acumulem em machos, podendo surgir novos mecanismos de compensação de dose como resposta ao acúmulo de alelos femininos no cromossomo X (HEWITT, 1979; RICE, 1996). Quando este novo mecanismo de compensação se expandir por todos os indivíduos da espécie, várias transformações podem ocorrer nos autossomos incorporados ao novo sistema cromossômico sexual, como exemplo, a heterocromatinização do neo-Y e alterações na distribuição de quiasmas entre os ex-homólogos

autossômicos ou até uma segunda fusão Rb Y-A, originando um sistema complexo de tipo neo- X_1X_2Y (MESA et al., 2001; FERREIRA e CELLA, 2006; FERREIRA e MESA, 2010).

Na ocorrência desses sistemas complexos de cromossomos sexuais múltiplos neo- X_1X_2Y , os braços do cromossomo metacêntrico neo- X_1 são denominados como descrito anteriormente para o sistema cromossômico de determinação sexual neo-XY, ao mesmo tempo em que o cromossomo neo-Y metacêntrico é formado pelos braços YL e YR, o mesmo compartilha homologia com os braços XR e com o neo- X_2 , respectivamente (WHITE, 1973). Exemplos de mecanismos cromossômicos de determinação sexual neo- X_1X_2Y foram observados em várias espécies como por exemplo *Paratylotropidia brunneri* (WHITE, 1941), *P. morsei* (WHITE, 1953), *Ronderosia dubius* (MESA e MESA, 1967; CASTILLO et al., 2010b) e espécies do gênero *Dichromatos* (CASTILLO et al., 2010a; FERREIRA e MESA, 2010).

Com base nestas evidências, a divergência morfológica progressiva do neo-Y em Orthoptera é resultante da perda de homologia, redução da recombinação, heterocromatinização e de rearranjos estruturais, além de mostrarem que o neo-Y diferenciado apresenta características de cromossomo sexual com heteroplicose positiva durante as primeiras etapas da meiose (SÁEZ, 1963; MESA, 1964; WHITE, 1973; HEWITT, 1979; MESA et al., 2001; CASTILLO et al., 2010a). Contudo, diferente de outros organismos como em espécies de *Drosophila* (CARVALHO, 2002; STEINEMANN e STEINEMANN, 2005; CARVALHO e CLARK, 2013), humanos (SKALESTKY et al., 2003; CARVALHO e CLARK, 2013) e plantas (NICOLAS et al., 2003; NAVAJAZ-PÉREZ et al., 2005; MATSUNAGA, 2009; KEJNOVSKY et al., 2009; KEJNOVSKY et al., 2013) a diferenciação molecular do neo-Y decorrente das modificações moleculares, passam a ser desconhecidas em Orthoptera.

Dentre as espécies com sistema múltiplo neo- X_1X_2Y em gafanhotos estão as quatro espécies representantes do gênero *Dichromatos*. Todas as quatro espécies do gênero foram estudadas por técnica clássica de coloração convencional, entretanto somente duas *D. lilloanus* e *D. schrottkyi* foram estudadas mais profundamente com caracterização por técnicas citogenéticas diferenciais e moleculares (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). Para melhor caracterização dos padrões de origem e evolução dos sistema sexual no gênero é necessário caracterizar as outras duas espécies por técnicas que revelem a composição específica dos cromossomos sexuais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os cromossomos da espécie *Dichromatos montanus* por técnicas de citogenética clássica e hibridização *in situ* florescente (FISH) para entendimento da composição e evolução do sistema sexual múltiplo da espécie.

2.2 Objetivos específicos e metas

Realizar a coloração convencional para entender a organização dos cromossomos sexuais.

Localizar e caracterizar a heterocromatina constitutiva por bandeamento C e fluorocromos base-específicos, buscando entender os possíveis tipos de sequência presentes no sistema sexual múltiplo da espécie.

Realizar a hibridização *in situ* fluorescente com distintas sondas para entender a composição do cromossomo sexual múltiplo.

Analisar os dados de maneira comparativa com outras espécies do gênero para entendimento da evolução dos sistemas sexuais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material biológico e pontos de coleta

Os espécimes de *Dichromatos montanus* foram coletados em Paraisópolis-MG. Os indivíduos machos foram anestesiados sendo dissecados os testículos. Estes foram preservados em etanol: ácido acético (3:1, v:v) e estocados em freezer -20°C. Tanto as pernas dos indivíduos machos como as fêmeas foram dissecadas e preservados em álcool 100% para a extração de DNA.

3.2 Preparo de lâminas, coloração convencional e bandeamento-C e CMA₃/DAPI

As lâminas foram preparadas por espalhamento de parte do testículo em ácido acético 45%. A coloração convencional foi realizada com Giemsa 8%. Para o bandeamento-C e CMA₃/DAPI as lâminas foram confeccionadas como descrito acima e incubadas em 0,2M HCl, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e tratadas com hidróxido de bário 5%, por 1 minutos, a 60 °C e em 2×SSC, pH 7,0, por 10 minutos, a 60 °C. As lâminas foram tratadas com fluorocromos: 0,5 mg/mL CMA₃, por 1,5 h, distamicina por 30 minutos e 2 µg/mL DAPI, por 30 minutos. Em seguida foram montados com a composição de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) 1:1, mais 2,5 mM MgCl₂.

3.3 Extração de DNA, isolamento de famílias multigênicas e telômeros

Os músculos das pernas de cada espécime foram utilizados para a extração de DNA. Esta foi realizada utilizando a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). As famílias multigênicas (rDNA 18S, gene de histona H3) foram isoladas por meio de PCR utilizando-se primers específicos desenhados para insetos. Para o DNAr 18S e gene de histona H3 foram utilizados os primers descritos por Cabral-de-Mello et al. (2010) e Teruel et al. (2010). As PCRs foram realizadas em 10 x PCR de Buffer Rnx, 0,2 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTPs, 2 mM de cada par de primers, 1 U de DNA Polymerase *Taq* Platinum (Invitrogen, San Diego, CA, USA) e 50-100 ng/µl de DNA dependendo da amostra. A sonda telomérica foi obtida por PCR usando os primers (TTAGG)₅ e (CCTAA)₅ como descrito por Ijdo et al. (1991).

3.4 Obtenção da fração C_{0t}

A técnica de cinética de reassociação (C_{0t}) foi realizada de acordo com Zwick et al. (1997) com modificações. Cerca de 10µg de DNA foram dissolvidos em 0,3 M de NaCl e degradados por DNase durante um minuto e trinta segundos. Os fragmentos gerados foram conferidos por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, as amostras foram desnaturadas à 95°C por 10 minutos e submetidas ao gelo por 10 segundos, sendo submetidas a uma temperatura de reassociação de 65°C por 25 minutos. O material foi tratado com S1 nuclease durante 8 minutos à 37°C. Finalmente, o DNA foi purificado em fenol:clorofórmio (1:1, v:v), sendo o resultado da fração C_{0t} confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5 Hibridização *in situ* fluorescente

As sequências de DNAs repetitivos de DNAr 18S, H3, repetição telomérica e fração C_{0t} foram marcadas com digoxigenina 11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) através da PCR ou com biotina 14-dATP (Invitrogen) através da *Nick translation*, seguindo recomendações do fabricante. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada usando o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações propostas por Cabral-de-Mello et al. (2010). As sondas foram detectadas usando anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) ou streptavidina alexa fluor-488 (Invitrogen). Todas as preparações foram contracoradas com DAPI e montadas com meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). As fotografias e sinais foram observados utilizando um microscópio Olympus BX61 equipado com uma lâmpada fluorescente e filtros adequados. As imagens foram fotografadas usando uma câmera digital DP70 em escala de cinza. Adicionalmente, as imagens foram pseudo-coradas em azul (cromossomos), vermelho ou verde (sinais), sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste usando Adobe Photoshop CS2.

4 RESULTADOS

A espécie *Dichromatos montanus* apresentou número diploide $2n=21$ e sistema sexual múltiplo neo- X_1X_2Y ♂. Os cromossomos autossômicos foram caracterizados como acrocêntricos. Os cromossomos sexuais apresentaram as seguintes morfologias: X_1 metacêntrico, X_2 acrocêntrico e Y metacêntrico. O maior elemento do sistema sexual é o cromossomo X_1 . Na metafase I, os cromossomos neo-sexuais foram observados na orientação convergente típica de um trivalente Robertsoniano, com o braço XR associado distalmente ao braço YL do cromossomo neo-Y e ao braço YR do cromossomo neo-Y distalmente associado ao cromossomo neo- X_2 (Figura 1a).

Por meio do bandeamento C foram observados blocos C-positivos correspondentes à heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os autossomos. Porém, nos cromossomos sexuais, apenas o neo-Y não apresentou regiões heterocromáticas, enquanto que no neo- X_1 e neo- X_2 esses blocos foram evidentes nas regiões pericentroméricas (Figura 1b). Quando submetidas à coloração sequencial CMA3/DA/DAPI essas regiões heterocromáticas apresentaram riqueza em bases C+G apenas no par 5 e no centrômero do neo- X_1 (Figura 1c-d).

Com relação à distribuição das regiões repetitivas, a técnica da fração C_{0t} evidenciou marcações nas regiões centroméricas de alguns autossomos (Figura 1e). Já nos cromossomos sexuais foram observados sinais de hibridização apenas no centrômero dos cromossomos neo- X_1 e neo- X_2 . (Figura 1e). Dentre as famílias multigênicas, as regiões da H3 foram localizadas na região pericentromérica do par 5 (Figura 2c), enquanto que sinais de marcação para o cluster de 18S rDNA foram observados no par 6 na região pericentromérica e no centrômero do neo- X_1 (Figura 2b).

Em busca de evidências citogenéticas de possíveis fusões cromossômicas envolvendo a origem do sistema sexual múltiplo, realizamos a marcação das regiões teloméricas. Estas foram localizadas nos terminais de todos os autossomos, enquanto que no neo- X_1X_2Y foram evidentes apenas nos terminais dos cromossomos, ou seja nos telômeros atuais (Figura 2a).

5 DISCUSSÃO

Embora o número cromossômico $2n=23♂/24♀$, com sistema cromossômico de determinação sexual $X0♂/XX♀$ seja o mais frequente na família Acrididae, existem algumas espécies com mecanismos cromossômicos sexuais derivados. As espécies com essa característica são observadas geralmente na região Neotropical, a qual apresenta uma grande abundância e diversidade de membros da subfamília Melanoplinae, onde os mecanismos sexuais derivados são frequentes. Essa subfamília apresenta em pelo menos 50 espécies com mecanismos cromossômicos de determinação sexual derivado dos tipos neo- $XY♂/XX♀$ e neo- $X_1X_2Y♂/X_1X_1X_2X_2♀$ (MESA et al., 1982; CASTILLO et al., 2010b). Um dos exemplos de representantes da subfamília Melanoplinae com distinto mecanismo de determinação cromossômica sexual é a espécie aqui estudada, *Dichromatos montanus*. Neste trabalho, além da confirmação do número cromossômico, detectamos que o sistema de determinação sexual em *D. montanus* foi similar ao observado em espécies do mesmo gênero, como, *D. lilloanus* e *D. schrottkyi* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). A alta frequência destes neo-sistemas está relacionado nesta subfamília com fusões centricas entre autossomos e cromossomos sexuais, inversões e perda da recombinação (MESA et al., 1982; CASTILLO et al., 2010a; FERREIRA e MESA, 2010). Em *D. montanus* os cromossomos neo-sexuais apresentaram a mesma origem e formação das espécies de mesmo gênero (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013), porém o cromossomo neo- X_1 foi o maior elemento e o não o Y como relatado na descrição citogenética das demais espécies do gênero, sugerindo amplificação diferencial de elementos repetitivos, causando a diferença de tamanho dos cromossomos observados nas espécies. Além disso, confirmamos a hipótese de que fusões centricas são originárias de quebras cromossômicas duplas com a perda de sequências teloméricas (WHITE, 1978; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). Isso foi possível devido à presença de sinais teloméricos apenas nos terminais dos cromossomos neo-X envolvidos no rearranjo.

A distribuição dos blocos C-positivos nas regiões pericentroméricas dos autossomos da espécie foi semelhante ao já descrito em outras espécies de gafanhotos (SANTOS et al 1983; JOHN et al 1985; CASTILLO et al 2010). Nos cromossomos sexuais, a heterocromatina restrita às regiões pericentroméricas dos cromossomos neo-X indicam a não disseminação de segmentos heterocromaticos após sua origem. Entretanto, a não ocorrência de regiões heterocromáticas no

neo-Y é interpretado como evidências da perda de pressão de seleção nas regiões não recombinadas durante sua diferenciação resultando em uma alta taxa de diversificação genética do cromossomo neo-Y (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). Dados similares foram obtidos com a hibridização da fração C_{0t} , sugerindo que a maioria do DNA repetitivo presente na espécie foi representada na fração C_{0t} . Esses dados também enfatizam a não dispersão acentuada de DNAs repetitivos nos cromossomos sexuais, assim como já observado para a espécie *D. schrottkyi* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013).

Com relação à localização do rDNA 18S, nossos dados foram semelhantes aos obtidos para os demais representantes do gênero *Dichromatos* relatado por PALACIOS-GIMENEZ et al. (2013). A presença do cluster de rDNA 18S nos cromossomos sexuais destas espécies indica uma característica comum para o grupo. Adicionalmente, os resultados originados com *D. montanus* reforçam a presença de diferentes caminhos evolutivos para os sistemas de determinação sexual neo-XY dentro da família Melanoplinae (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). Já manutenção dos sinais de hibridização da histona H3 em apenas um par autossômico em *D. montanus* corrobora a característica ancestral para desse marcador dentro de Acrididae (CABRERO et al., 2009). Ressalta-se também que a ausência de dispersão dos sítios de H3 em *D. montanus* demonstra que essa espécie traçou uma evolução cromossômica similar ao observado para *D. schrottkyi*, diferenciando-se assim de *D. lilloanus* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho possibilitaram o melhor entendimento da evolução do sistema de determinação cromossômica sexual em *D. montanus*. O estudo também reforçou a presença de distintos mecanismos de diferenciação cromossômica dentro do gênero *Dichromatos*. Além disso, a similaridade de diferentes marcadores cromossômicos entre *D. montanus* e *D. schrottkyi*, evidenciou um relacionamento próximo entre essas espécies.

REFERÊNCIAS

- AYLING, L.J.; GRIFFIN, D.K. The evolution of the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 99, n. 1-4, p.125-140, 2002.
- BIDAU, C.J.; MARTI, D.A. Meiosis and the Neo-XY system of *Dichroplus vittatus* (Melanoplinae, Acrididae): a comparison between sexes. **Genetica**, v. 110, n. 2, p.185-194, 2000.
- CABRAL-DE MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, p. 333-400, 2010.
- CABRERO, J.; TERUEL, M.; CARMONA, F.D.; JIMÉNEZ, R.; CAMACHO, J.P.M. Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 119, n. 1-2, p. 135-142, 2007.
- CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Res** 2008, 16:595–607.
- CABRERO, J.; LÓPEZ –LEÓN, M. D., TERUEL, M., CAMACHO, J. P. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome Research** 2009, 17:397–404.
- CARDOSO, H.; SAEZ, F.A.; BRUM-ZORRILLA, N. Location, structure and behaviour of C-heterochromatin during meiosis in *Dichroplus silveiraguidoi* (Acrididae-Orthoptera). **Chromosoma**, v. 48, n. 1, p. 51-64, 1974.
- CARVALHO, A.B. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 12, n. 6, p. 664-668, 2002.
- CARVALHO, A.B.; CLARCK, A.W. Efficient identification of Y chromosome sequences in the human and *Drosophila* genomes. **Genome Research**, v. 23, n. 11, p.1894-1907, 2013.
- CASTILLO, E.R.D.; BIDAU, C.J.; MARTÍ, D.A. Neo-sex chromosome diversity in Neotropical melanopline grasshoppers (Melanoplinae, Acrididae). **Genetica**, v. 138, n. 7, p. 775-786, 2010a.
- CASTILLO, E.R.; MARTI, D.A.; BIDAU, C.J. Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. **Journal of Orthoptera Research**, v. 19, n. 2, p. 213-231, 2010b.
- CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.

CIGLIANO, M.M.; LANGE, C.E. Orthoptera. In: Morrone, J.J.; Coscarón, S. (Eds). Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonomica. Ediciones Sur, La Plata, Argentina, p. 67-83, 1998.

CIGLIANO, M.M.; LANGE, C.E. Systematic revision and phylogenetic analysis of the South American genus *Chlorus* (Orthoptera, Acridoidea, Melanoplinae). **Zoologica Scripta**, v. 36, n. 3, p. 241-254, 2007.

CIGLIANO, M.M. Review of the South American genus *Eurotettix* Bruner (Orthoptera, Acridoidea, Melanoplinae). **Systematic Entomology**, v. 32, n. 1, p. 176-195, 2007.

COHEN, S.; YACOBI, K.; SEGAL, D. Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in *Drosophila*. **Genome Res** 2003, 13:1133–1145.

COHEN, S.; AGMON, N.; SOBOL, O.; SEGAL, D. Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. **Mob DNA** 2010, 1:11.

FERREIRA, A.; CELLA, D.M. Chromosome structure of *Eneoptera surinamensis* (Orthoptera, Grylloidea, Eneopterinae) as revealed by C, NOR and N banding techniques. **Chromosome Science**, v.9, n. 2, p. 47-51, 2006.

FERREIRA, A.; MESA, A. Cytotaxonomy of the genus *Dichromatos* Cigliano 2007 (Orthoptera, Acridoidea, Melanoplinae). **Journal of Orthoptera Research**, v. 19, n.2, p. 233-237, 2010.

HEWITT, G.H. Orthoptera. Grasshoppers and Crickets. In: Animal Cytogenetics 3. Insecta 1, (Eds) by B. John. Gerbrüder Borntraeger: Berlin-Suttgart, pp 1-170. 1979.

HOBZA, R.; KEJNOVSKY, E.; VYSKOT, B.; WIDMER, A. The role of chromosomal rearrangements in the evolution of *Silene latifolia* sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 278, n. 6, p. 633-638, 2007.

IJDO, J.W.; WELLS, R.A.; BALDINI, A.; REEDERS, S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JOHN, B.; FREEMAN, M. Cytogenetic systems of grasshoppers and locusts. III. The genus *Tolgadia* (Oxyinae: Acrididae). **Chromosoma**, v. 55, p. 105-119, 1976.

JOHN, B.; KING, M. The inter-relationship between heterochromatin distribution and chiasma distribution. **Genetica**, v. 66, p.183-194, 1985.

KEJNOVSKY, E.; HOBZA R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 533-541, 2009.

KEJNOVSKY, E. MICHALOVOVA, M.; STEFLOVA, P.; KEJNOVSKA, I.; MANZANO, S.; HOBZA R.; KUBA, Z.; KOVARIK, J.; JAMILENA, M.; VYSKOT, B. Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. **PLoS ONE**, v. 8(1): e45519, p. 1-10, 2013.

MATSUNAGA, S. Junk DNA promotes sex chromosome evolution. **Heredity**, v. 102, n. 6, p. 525-526, 2009.

MESA, A. Los cromosomas de *Pachyossa* sp. (Orthoptera, Ommexechidae). **Revista de la Sociedad Uruguaya de Entomología**, v. 6, p. 49-54, 1964.

MESA, A.; FERREIRA, A.; CARBONELL, C.S. Cariología de los Acridoideos Neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. **Annales Société Entomologique de France**, v. 18, p. 507-526, 1982.

MESA, A.; FONTANETTI, C.S.; GARCÍA-NOVO, P. Does an X-autosome centric fusion in Acridoidea condemn the species to extinction? **Journal of Orthoptera Research**, v.10, n. 2, p. 141-146, 2001.

MESA, A.; GARCÍA-NOVO, P.; DOS SANTOS, D. X_1X_2O (male)- $X_1X_1X_2X_2$ (female) chromosomal sex determining mechanism in the cricket *Ciclotyloides americanus* (Orthoptera, Grylloidea, Mogoplistidae). **Journal of Orthoptera Research**, v. 11, n. 1, p. 87-90, 2002.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 121-52, 2005.

NICOLAS, M.; MARAIS, G.; VLADKA H.; V.; BOHUSLAV, J.; LAPORTE, V.; VYSKOT, B.; MOUCHIROUD, D.; NEGRUTIU, I.; CHARLESWORTH, D.; MONÉGER, F. A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. **PLoS Biology**, v. 3, n. 1, p. e4, 2004.

NGUYEN, P.; SÝKOROVÁ, M.; ŠÍCHOVÁ, J.; KŮTA, V.; DALÍKOVÁ, M.; FRYDRYCHOVÁ, R.C.; NEVEN, L.G.; SAHARA, K.; MAREC, F. Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6931-6936, 2013.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC Evolutionary Biology** 13:167, 2013.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

- POCCO, M.E.; DAMBORSKY, M.P.; CIGLIANO, M.M. Comunidades de Ortópteros (Insecta, Orthoptera) en pastizales del Chaco Oriental Húmedo, Argentina. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 33, n. 2, p. 119-129, 2010.
- RICE, W.R. Evolution of the Y sex chromosome in animals. **Bioscience**, v. 46, n.5, p. 331-343, 1996.
- SÁEZ, F.A. Gradient of the heterochromatinisation in the evolution of the sexual system “neo-X-neoY”. **Port Acta Biol Ser A**, v. 7, p. 111-138, 1963.
- SÁEZ, F.A.; PÉREZ-MOSQUERA, G. Structure, behaviour and evolution of the chromosomes of *Dichoplus silveiraiguidoi* (Orthoptera, Acrididae). **Genetica**, v. 47, p. 105-113, 1977.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001.
- SANTOS, J.L.; ARANA, P.; GIRÁLDEZ, L. Chromosome C-banding patters in Spanish Acridoidea. **Genetica**, v. 61, p. 65-74, 1983.
- SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P.J.; CORDUM, H.S.; HILLIER, L.; BROWN, L.G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; BIERI, T.; et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825-837, 2003.
- STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 134-143, 2005.
- TERUEL, M.; CABRERO, J.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chomosome**, v. 119, v. 271-225, 2010.
- VELTSOS, P.; KELLER, I.; NICHOLS, R.A. Geographically localised bursts of ribosomal DNA mobility in the grasshopper *Podisma pedestris*. **Heredity**, v. 103, n.1, p. 54-61, 2009.
- VELTSOS, P.; KELLER, I.; NICHOLS, R.A. The inexorable spread of a newly arisen neo-Y chromosome. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 5, p. e1000082, 2008.
- WHITE, M.J.D. Animal Cytology and Evolution. 3rd ed. **Cambridge University Press**, Cambridge. 1973.
- WHITE, M. J. D. Modes of Speciation. San Francisco: **WH Freeman and Company**; 1978.
- YOSHIDO, A.; ŠÍCHOVÁ, J.; KUBÍČKOVÁ, S.; MAREC, F.; SAHARA, K. Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmths, *Samia cynthia* ssp. **Chromosome Research**, v. 21, n. 2, p. 1-16, 2013.

ZWICK, M.S.; HANSON, R.E.; MCKNIGHT, T.D.; ISLAM-FARIDI, H.M.; STELLY, D.M.; WING, R.A.; PRICE, J.H. A rapid procedure for the isolation of C₀t-1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.

FIGURAS

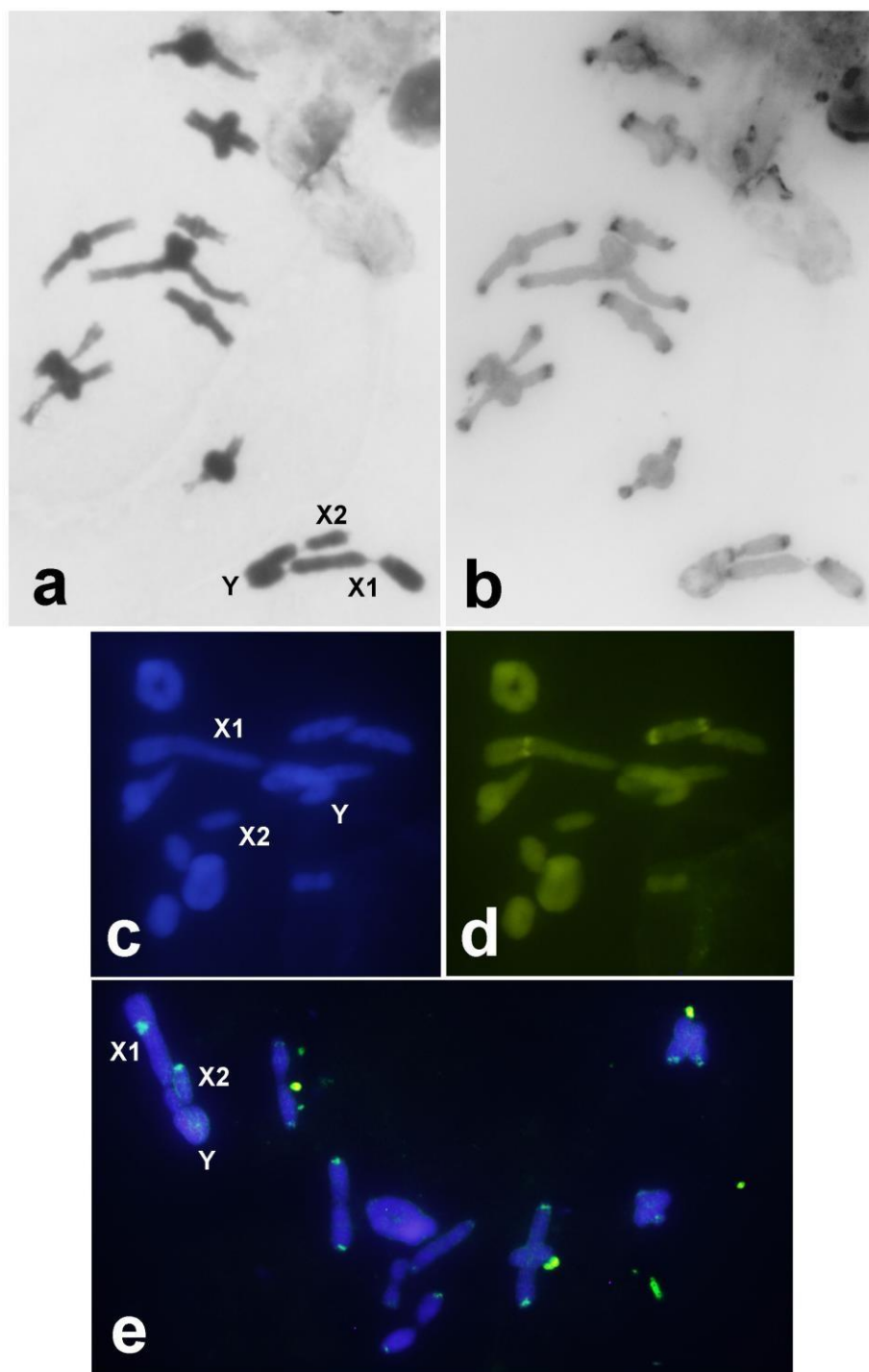


Figura 1. Células testiculares de *Dichromatos montanus* submetidas à coloração convencional com GIEMSA (a), bandamento- C (b), coloração por DAPI/DA/CMA₃ (c,d) e hibridização in situ fluorescente (FISH) com sonda da fração Cot (e).

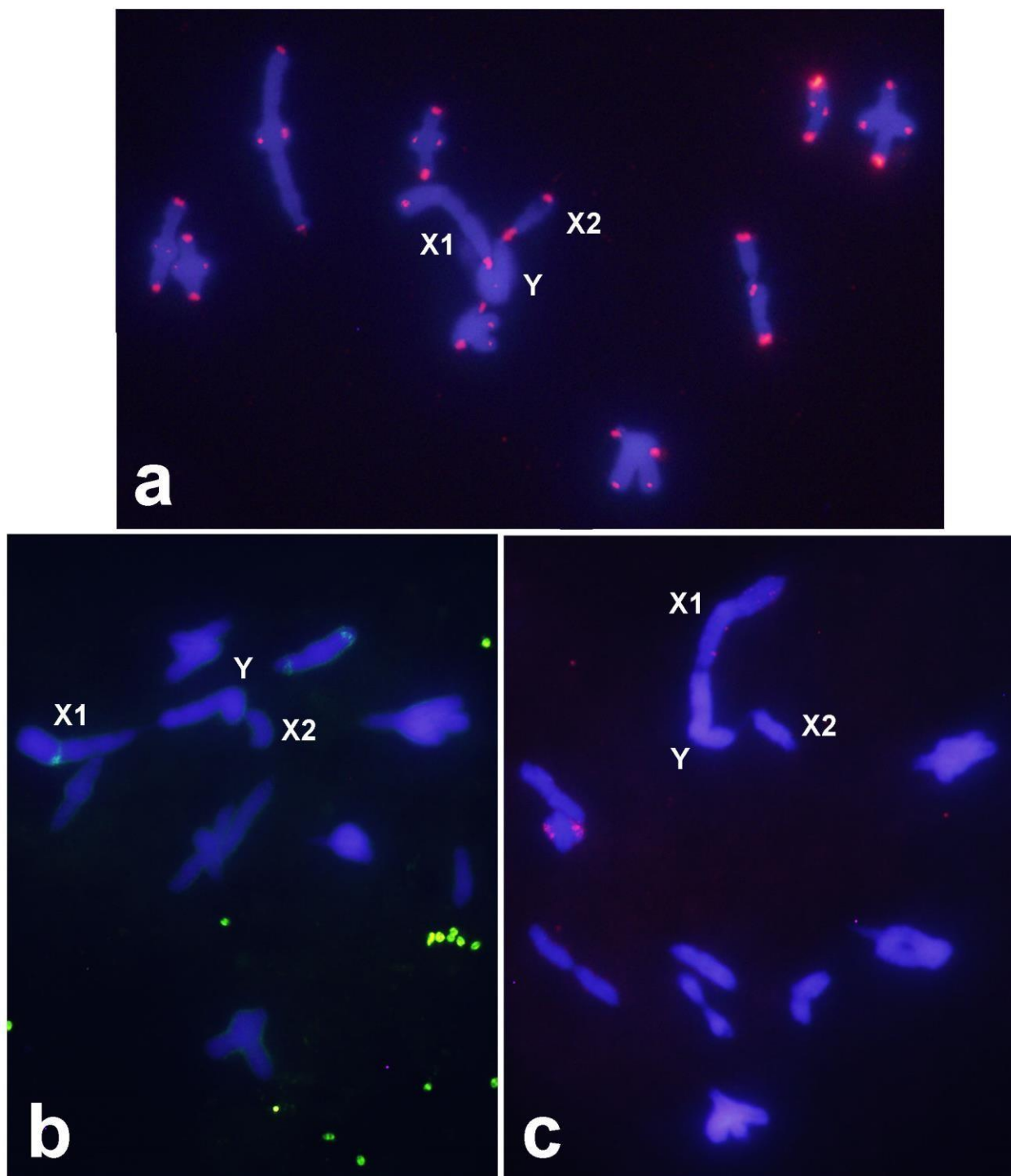


Figura 2. Hibridização in situ fluorescente (FISH) em células meióticas de *Dichromatos montanus* utilizando-se as sondas teloméricas (a), rDNA 18S (b) e histona H3 (c).