
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ZOOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA POR
COLORAÇÃO CONVENCIONAL E DIFERENCIAL
DE TRÊS POPULAÇÕES DE GRILOS
DO GÊNERO *Zucchiella* MELLO, 1990
(TRIGONIDIIDAE, NEMOBIINAE).**

CAURÉ BARBOSA PORTUGAL

**ORIENTADOR: PROF. DR. ALEJO MESA LARRAMBERE
CO-ORIENTADOR: PROF^a DR^a CARMEM S. FONTANETTI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Zoologia.

Junho - 2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Alejo Mesa pela orientação, pelas sugestões, revisões e especialmente pelo exemplo de perseverança como pesquisador e pessoa.

Agradeço à Prof^a Dr^a Carmem S. Fontanetti pelo acompanhamento das atividades, pelas sugestões e revisões e, em especial, pela disponibilidade na amizade.

Agradeço às Prof^{as} Dr^{as} Doralice M. Cella, Prof^a Dr^a Sanae Kasahara e Prof^a Dr^a Ana Paula Zampieri Silva-de Pietri pelo compartilhamento de idéias e pelas importantes sugestões.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. R. Davenport (Universidade de Illinois, E.U.A.) pela atenção e pelos dados fornecidos.

Meus agradecimentos pessoais ao amigo e companheiro, Akio R. Miyoshi, pela ajuda nos trabalhos de coleta e pelas inúmeras idéias compartilhadas ao longo de quase oito anos.

Meus agradecimentos a Cristiane M. Mileo pelo auxílio na arte de imagens e, acima de tudo pela amizade inquebrável.

Meus agradecimentos ao pessoal técnico do Departamento de Biologia, Rogilene A. Prado e Gerson, que foram imprescindíveis para o andamento do trabalho.

Meus agradecimentos à direção e coordenação do Colégio Puríssimo Coração de Maria pela compreensão e pelo apoio na realização deste trabalho.

Meus agradecimentos ao pessoal responsável pelo Núcleo Santa Virgínia (Parque Estadual da Serra do Mar) e pela Fazenda Capricórnio.

Agradeço aos amigos Prof. Dr. Alberto Arab, Andriago Monroe Pereira, José Augusto O. David, Kleber do Espírito Santo Filho (“Mamute”), Eduardo Feltran Barbieri (“Bob”), Tatiana Souza, Thais C. C. Fernandez, Prof. Dr. José Chaud Neto, Carlos Harmitt, Mércia Palombo e tantos outros. Todos, de alguma forma, tiveram real importância na amizade, na convivência e no compartilhamento de idéias.

Agradeço aos meus pais, Osmar e Antonieta, e a minha irmã, Maíra, pelo incentivo e amor incondicionais e a toda minha família pelo apoio.

Agradeço à Andréia pelo carinho, pela companhia, pela compreensão e paciência ao longo destes anos.

A todos os que de alguma forma foram presentes, os de agora, os de antes e os de sempre, meu muito obrigado.

**AOS MEUS PAIS, OSMAR E ANTONIETA
E A TODA MINHA FAMÍLIA,
OFEREÇO.**

**AOS MEUS AMIGOS TODOS,
MESMO ATRAVÉS DO TEMPO E DO ESPAÇO,
OFEREÇO.**

**A ANDRÉIA,
OFEREÇO.**

Das utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!

(M. Quintana)

ÍNDICE

RESUMO	01
ABSTRACT	03
I. INTRODUÇÃO	05
II. REVISÃO DA LITERATURA	08
1. Taxonomia	08
2. Estudos Citogenéticos por Coloração Convencional	09
3. Estudos Citogenéticos por Coloração Diferencial	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Material	19
2. Métodos	20
2.1. Preparações Cromossômicas	20
2.2. Bandamento-C	21
2.3. Impreganaç�o por Nitrato de Prata (Ag ⁺ RON)	22
2.4. Colora�o Simultânea por Fluorocromos AT e CG Específicos	22
2.5. Documenta�o	23
2.6. Análise Cromossômica	23
IV. RESULTADOS	24
1. Artigo I: Chromosomes of <i>Zucchiella atlantica</i> Mello, 1990 (Orthoptera, Trigonidiidae) into an overview of the Nemobiinae crickets.	25
1.1. Abstract	25
1.2. Introduction	26
1.3. Material and Methods	26
1.4. Results and Discussion	27
1.5. Literature Cited	29

Figure 1	31
Table 1	32
2. Artigo II: Caracterização cromossômica por coloração convencional e diferencial de três populações de grilos <i>Zucchiella atlantica</i> Mello, 1990 (Trigonidiidae, Nemobiinae) do Brasil.	34
2.1. Resumo	34
2.2. Introdução	35
2.3. Material e Métodos	36
2.4. Resultados	38
2.5. Discussão	39
2.6. Literatura Citada	42
Figura 1	46
Figura 2	47
Figura 3	48
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
VI. LITERATURA CITADA	53

RESUMO

Zucchiella atlantica Mello, 1990 foi inicialmente descrita para regiões de Mata Atlântica, em Ubatuba e Caraguatatuba (SP). Mais recentemente duas novas populações foram encontradas em ambientes de cerrado (Corumbataí, SP) e na Serra do Mar (São Luiz do Paraitinga, SP). Estudos preliminares, principalmente de morfologia, sugeriam que tais populações pudessem compreender espécies crípticas do gênero *Zucchiella*. O presente trabalho propõe a caracterização cromossômica por coloração convencional, bandamento-C, impregnação por prata (Ag^+ RON) e coloração simultânea por fluorocromos AT e CG específicos das três populações dentro de uma revisão dos estudos citogenéticos em Nemobiinae com o objetivo de testar a hipótese de que estas constituam raças cromossômicas ou mesmo espécies crípticas.

O número cromossômico encontrado foi uniforme em todas as populações, $2n\sigma=23$, XO e $2n\varphi=24$, XX. Os pares 2, 4, 5, 6, 8 e 10 são submetacêntricos, os pares 1, 3, 7, 9 e 11 são acrocêntricos e o cromossomo sexual é metacêntrico. O padrão de bandamento-C revelou distribuição da heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas e nos braços curtos do par 6. As RON's correspondem aos braços curtos do par 6 e são ricas em bases CG (CMA₃ positivas). O par 5 é heteromórfico com variação intra-individual nas três populações, mas um de seus homólogos apresentou um grande bloco terminal Ag^+ e C-positivo apenas na população de Ubatuba.

O número diplóide em 31 espécies de nemobíneos estudadas por diversos autores varia de $2n♂=7$ a $2n♂=21$ e o sistema de determinação do sexo é sempre do tipo XX-XO. *Zucchiella atlantica* apresenta o maior número cromossômico dentre os Nemobiinae e, como a tendência em Orthoptera é de redução no número cromossômico, esta condição pode ser interpretada como plesiomórfica.

Na população de Ubatuba, o segmento Ag^+ e C-positivo do homólogo heteromórfico do par 5 corresponde a uma RON secundária e não é rico em bases CG como as RON's primárias. Esta região cromossômica deve estar envolvida em atividade transcricional e provavelmente tem implicações fisiológicas para os indivíduos. A presença de heterocromatina deve estar relacionada com a proteção deste segmento cromossômico e também pode estar desempenhando alguma função de desativação ocasional de genes reguladores de transcrição

ABSTRACT

Zucchiella atlantica Mello, 1990 was firstly described to the Atlantic Rain Forest in Ubatuba and Caraguatatuba (São Paulo State). Other two populations were recently found in regions of *cerrado* (Corumbataí, São Paulo State) and in Serra do Mar Rain Forest (São Luiz do Paraitinga, São Paulo State). Preliminary studies on morphology traits, suggested that these populations could be sibling species of the genus *Zucchiella*. Chromosomal characterization by standard staining, C-banding, silver staining and simultaneous fluorochrome staining are here proposed inside an overview of the cytogenetic studies in Nemobiinae.

Chromosomal number found was uniform in all populations, $2n\sigma=23$, XO and $2n\phi=24$, XX. Pairs 2, 4, 5, 6, 8 and 10 are submetacentric, pairs 1, 3, 7, 9 and 11 are acrocentric and the sexual chromosome is metacentric. C-banding pattern revealed distribution of constitutive heterochromatin in the pericentromeric regions and in the short arms of the sixth pair. NOR's correspond to those short arms of the sixth pair and are CMA₃ positive (CG rich). The fifth pair is heteromorphic with intra-individual variation and one of its homologue presents an Ag⁺ and C-positive terminal region only in the Ubatuba population.

Diploid number between 31 nemobine species studied by several authors ranges from $2n\sigma=7$ to $2n\sigma=21$ and the sex determining mechanism is always the XX-XO one. *Zucchiella atlantica* has the highest number and as trends in Orthoptera species are to

reduce chromosomal number, it could be interpreted as a plesiomorphic condition in the group.

In the Ubatuba population the Ag⁺ and C-positive short arm of the heteromorphic homologue of pair 5 is equivalent to a secondary NOR that is not rich in CG bases as the primary NOR's. This chromosomal region must be involved in transcriptional activity and probably sets physiological effects to the individuals. Presence of heterochromatin must represent a protection mechanism of this chromosomal segment and could also be related to casual non-activation of transcription regulatory genes.

I. INTRODUÇÃO

Os insetos da ordem Orthoptera compreendem dois grandes grupos tidos como subordens da mesma. A subordem Caelifera reúne gafanhotos (acrídeos), tridactilídeos, tetrígídeos e eumastacídeos e a subordem Ensifera relaciona os grilos (grilídeos), esperanças (tetigonídeos) e grilacrídeos. Dentre os Ensifera, a superfamília Grylloidea congrega uma grande variedade de tipos morfológicos e chama a atenção pelo pouco conhecimento que se tem de sua biologia e diversidade como bem apontou Otte (1994) ao estimar que atualmente só se conhece cerca de um décimo de sua fauna. Neste contexto, vale ainda ressaltar que os trabalhos em taxonomia no grupo baseiam-se essencialmente em parâmetros morfológicos externos e de genitália masculina, o que, em diversos casos, mostra-se insuficiente.

Estudos de outras naturezas têm fornecido informações importantes no que se refere à discriminação interespecífica, envolvendo desde análises de bioacústica e inúmeras técnicas de citogenética convencional e molecular. Os estudos cromossômicos, por exemplo, têm ganhado nova ênfase e apontado novas perspectivas para diversos problemas

existentes entre espécies morfológicamente semelhantes e de difícil distinção através da taxonomia clássica. Os trabalhos de citogenética em populações naturais em Orthoptera têm fornecido muitos exemplos de variação cromossômica intra e interespecífica, sendo suas principais variações originadas em rearranjos como inversões pericêntricas, translocações recíprocas, fusões cêntricas e fissões que podem comprometer tanto autossomos quanto cromossomos sexuais, presença de cromossomos supernumerários e segmentos cromossômicos supernumerários (HEWITT, 1979).

De acordo com White (1973) se, por um lado, já existe um conhecimento razoavelmente difundido sobre morfologia e mecanismos cromossômicos de diversos insetos da ordem Orthoptera, a situação é bastante diferente quando se aborda o grupo amplamente diversificado dos Grylloidea e particularmente com relação à entomofauna da região neotropical. Sem perder de vista o fato de que diversas catástrofes eventuais, isolamentos e re-expansões em eras glaciais recentes promoveram a divergência cariotípica dentre os Orthoptera e que os trezentos milhões de anos ou mais nos quais se tem registro da existência desse grupo promoveram amplas oportunidades para mudanças cromossômicas, morfológicas e comportamentais (GWYNNE et al., 1996), é importante considerar a análise cromossômica, sob a aplicação de diversas técnicas, como instrumento extremamente valioso no estudo de espécies crípticas, na constatação de variabilidade cariotípica, comportamento meiótico dos cromossomos e polimorfismos. Os Grylloidea, portanto, muito têm a contribuir na elucidação de eventos de micro-evolução, na compreensão de mecanismos complexos de determinação do sexo e de comportamento cromossômico bem como tantas outras informações que a citogenética está apta a fornecer.

Dentro da subfamília Nemobiinae (Trigonidiidae), o gênero monotípico *Zucchiella* chama a atenção por se tratar de pequenos grilos ápteros de serrapilheira que provavelmente possuem baixa vagilidade. O gênero foi descrito apenas para as regiões de Ubatuba e Caraguatatuba (SP) (MELLO, 1990), mas recentemente foram também encontrados espécimens desse gênero em áreas de cerrado (Corumbataí, SP) e a cerca de 800 metros de altitude na Serra do Mar (São Luiz do Paraitinga, SP) (PORTUGAL, 2002).

Alguns resultados parciais apontados por Portugal (2002), levantavam a hipótese de que as três populações de *Zucchiella* Mello, 1990, ocupando ambientes diversos e descontínuos, pudessem constituir espécies crípticas ou raças cromossômicas e que análises mais detalhadas de citogenética poderiam evidenciar diferenças que justificassem tais abordagens. Desta forma, o presente trabalho propõe-se a caracterizar citogeneticamente três populações de grilos do gênero *Zucchiella* de acordo com técnicas de coloração cromossômica convencional, bandamento-C, impregnação por íons prata para marcação de regiões organizadoras de nucléolo (Ag^+ RON) e marcação por fluorocromos AT e CG específicos.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. TAXONOMIA

A ordem Orthoptera encontra-se atualmente subdividida em duas subordens distribuídas em todo o mundo. A subordem Caelifera caracteriza-se pela presença de antenas curtas e reúne os gafanhotos de modo geral. A subordem Ensifera caracteriza-se pelos ortópteros com antenas longas e agrega o que conhecemos por grilos, paquinhos e esperanças.

Dentre os grilos (superfamília Grylloidea), o gênero monotípico *Zucchiella* pertence à família Trigonidiidae, subfamília Nemobiinae. De acordo com Mello (1990), diversos gêneros americanos de grilos nemobíneos têm sido alocados na tribo Pteronemobiini devido à presença de um espinho glandular especializado na região proximal da tíbia posterior dos machos. A outra tribo, Nemobiini, não possui esta característica (VICKERY, 1973; VICKERY & JOHNSTONE, 1970; 1973) e, de acordo com este critério, *Zucchiella* deveria pertencer a esta tribo.

Zucchiella atlantica Mello, 1990 caracteriza-se por compreender pequenos grilos de serrapilheira, com um comportamento gregário e de baixa vagilidade. Ambos os sexos são ápteros, com ausência de tímpano auditivo nas tíbias anteriores, apresentam o corpo coberto por cerdas longas, tíbias posteriores com quatro espinhos dorsais internos e quatro externos

e três espinhos apicais internos e três externos, sendo os dois superiores internos providos de fileiras de cerdas.

Podemos determinar a posição taxonômica desta espécie como segue:

- ⇒ Ordem Orthoptera
 - ⇒ Subordem Ensifera
 - ⇒ Superfamília Grylloidea
 - ⇒ Família Trigonidiidae
 - ⇒ Subfamília Nemobiinae
 - ⇒ Tribo Nemobiini
 - ⇒ *Zucchiella atlantica*

2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS POR COLORAÇÃO CONVENCIONAL

A maioria dos estudos citogenéticos em Orthoptera está voltada para os Acridoidea, sendo um número muito reduzido os realizados em Grylloidea. Deste modo, a constatação de números cromossômicos virtualmente constantes em alguns grupos de Orthoptera, como é o caso de Acrididae *s. str.* (Acridoidea: Cryptosacci), com $2n\sigma=23$ e Pygmothidae e Pamphagidae (Chasmosacci), com $2n\sigma=19$ (WHITE, 1973), não se verifica dentre os Grylloidea, que constitui um grupo relativamente mais antigo e, portanto, muito mais diversificado. No que diz respeito à subfamília Nemobiinae (Grylloidea: Trigonidiidae), a bibliografia disponível também revela uma composição bastante variada quanto ao número cromossômico.

Uma quantidade significativa de trabalhos foi realizada em citogenética de Nemobiinae, tanto que dos 51 gêneros atualmente catalogados nesta subfamília (OTTE et al., 2001) nove deles contam com espécies que apresentam algum tipo de estudo citológico. Contudo, muitas destas publicações são bastante antigas e estão principalmente relacionadas a entomofauna das regiões asiática e neártica.

Diversos destes trabalhos resumem-se a descrições de número e morfologia cromossômicos, alguns até com propostas de comparações filogenéticas hoje

reconhecidamente equivocadas. Exemplo disto é a descrição do número cromossômico de duas espécies de nemobíneos asiáticos com base em metáfases espermatogoniais, *N. csikii* (= *Dianemobius* (*Dianemobius*) *csikii*) e *Nemobius fasciatus* (= *Allonemobius fasciatus*) (HONDA, 1926), onde se fazia uma tentativa de relação filogenética desta última com *Loxoblemmus arietalus* (Gryllidae) a partir de morfologia cromossômica.

Subseqüentemente, Ohmachi (1927a) procurou ressaltar a importância do número cromossômico, estabelecendo relação diretamente proporcional entre o número cromossômico e o tamanho dos mesmos dentro do complemento da espécie. A suposição de Ohmachi era a de que, em determinados grupos mais intimamente relacionados, a quantidade total de cromatina seria constante para cada espécie. Desta forma, procura deixar bastante explícito a importância de se associarem informações citogenéticas à taxonomia em Gryllidae (=Grylloidea), com atenção especial aos cromossomos sexuais. Ohmachi (1927b). Ele também propõe uma nova classificação para a família Gryllidae (=Grylloidea) baseada em padrões de caracteres somáticos, comportamentais e principalmente nas características dos cromossomos sexuais. Neste contexto, sugere a separação do gênero *Nemobius*, para a formação da subfamília Nemobiinae, mais intimamente relacionada a Trigonidiidae do que a Gryllidae.

Baseando-se no estudo de 18 espécies de Grylloidea, Ohmachi (1929) reitera suas afirmações de que o número cromossômico teria um menor valor taxonômico quando comparado às características dos cromossomos sexuais. Neste estudo são apresentados o número e morfologia cromossômicos de *Nemobius flavoantennalis* (= *Dianemobius* (*Polionemobius*) *flavoantennalis*) e *N. furumagiensis* (= *Dianemobius* (*Dianemobius*) *furumagiensis*). Para esta primeira espécie, com $2n\sigma=17$, o autor diagnostica o mesmo número diplóide encontrado em *N. yezoensis* e *N. nigrofasciatus* (= *Pteronemobius* (*Pteronemobius*) *nigrofasciatus*) salientando, contudo, que tratavam-se de complementos bastante distintos um do outro, quando se considerava a morfologia cromossômica.

Em 1935, Ohmachi apresenta um estudo mais abrangente e estabelece novas informações citogenéticas para nove subfamílias de Grylloidea, inclusive Nemobiinae. Propôs-se aí, de forma mais clara, uma comparação entre os complementos cromossômicos das espécies e sua relação taxonômica no grupo. Para as oito espécies do gênero *Nemobius*,

o autor relata a existência de quatro configurações cariotípicas para o Velho Mundo, sendo elas $2n\sigma=11$, $2n\sigma=15$, $2n\sigma=17$ e $2n\sigma=19$. Verifica-se também uma uniformidade quanto ao mecanismo de determinação do sexo, do tipo XX (fêmeas)- XO (machos), bem como quanto à morfologia dos cromossomos sexuais. A indicação de dois casos de ocorrência de heteromorfismo estrutural intra-individual em nemobíneos, *N. nigrofasciatus* (= *Pteronemobius* (*Pteronemobius*) *nigrofasciatus*) e *N. yezoensis* também chama a atenção neste caso. O autor admite a necessidade de mais estudos para o grupo, mas já atenta para o fato de os cromossomos metacêntricos serem mais freqüentes em espécies com menor número cromossômico e reforça a idéia da importância taxonômica sobre tamanho e morfologia dos cromossomos sexuais.

Informações mais detalhadas sobre *N. sylvestris* foram fornecidas por Favrelle (1936) que também fez uma comparação sucinta com outras espécies relacionadas, *i.e.*, *N. csikii*, *N. yezoensis*, *N. nigrofasciatus*, *N. flavoantennalis* e *N. yezoensis*, reiterando a classificação da subfamília Nemobiinae proposta por Ohmachi (1927b).

Reforçando os trabalhos sobre nemobíneos na região asiática, é imprescindível citar os de Manna & Bhattacharjee (1964; 1968), principalmente na tentativa de se estabelecer um contexto citotaxonômico para o grupo. De acordo com Ohmachi (1935), por exemplo, *N. mikado* (= *Dianemobius mikado*) é sinônimo de *P. taprobanensis* (= *Dianemobius* (*Polionemobius*) *taprobanensis*), porém, Manna & Bhattacharjee (1964) discordam em função de certas diferenças citológicas observadas, inclusive quanto à existência de polimorfismo cromossômico estrutural nesta última, que não foi identificado em *N. mikado*.

A ocorrência de polimorfismo em grilos não é rara e tem sido relatada tanto em função de variação do número de cromossomos em diferentes indivíduos de uma mesma espécie (HONDA, 1926; SUZUKI, 1932; 1933; OHMACHI, 1935; OHMACHI & UESHIMA, 1957) quanto em função de variação cromossômica estrutural (OHMACHI, 1935; MANNA & BHATTACHARJEE, 1962; 1963). Discute-se que a ocorrência de heteromorfismos pode estar associada a eventos de duplicação ou deleção de heterocromatina. Na tentativa de explicar o significado desses acontecimentos, White (1973) já especulava a respeito da variação de material heterocromatínico nas populações.

Outras especulações foram feitas a respeito da ocorrência de heteromorfismos dentre os Nemobiinae a partir da análise do cariótipo e de medidas cromossômicas em onze espécies da Índia (MANNA & BHATTACHARJEE, 1968). Neste estudo, os autores documentaram tanto a ocorrência de inversões heterozigotas quanto diferenças métricas entre espécies com o mesmo número diplóide. Os autores propõem que determinados rearranjos estruturais tiveram um papel mais acentuado no processo de evolução cariotípica no grupo do que os simples mecanismos de fusão ou fissão propostos por Ohmachi (1935).

No caso do Novo Mundo, Vickery & Johnstone (1970) compilaram a existência de apenas três cariótipos distintos para os Nemobiinae da região Neártica, sendo eles $2n\♂=7$, $2n\♂=15$ e $2n\♂=19$. Posteriormente, o grupo “*Pteronemobius*” revelou complementos que variavam de $2n\♂=11$ a $2n\♂=19$, indicando a possibilidade de tratar-se, na verdade, de mais de um gênero envolvido (VICKERY, 1973).

Novas tentativas de uma abordagem citotaxonômica foram estabelecidas também entre os gêneros *Neonemobius*, *Allonemobius* e *Eunemobius* (LIM, 1971) a partir de dados morfológicos, ecológicos e citológicos de diversos estudos e sobre cinco espécies da América do Norte, i.e., *Neonemobius palustris*, *Allonemobius fasciatus*, *A. allardi*, *A. griseus griseus* e *Eunemobius carolinus carolinus*. O autor acredita que, de modo geral, a tendência na subfamília Nemobiinae tenha sido de redução de número cromossômico como resultado de eventos de fusão cêntrica. Tal afirmativa baseia-se no caso da separação do gênero *Eunemobius* de *Allonemobius* (DAVENPORT, 1960) em que se especulava também o fato de autossomos acrocêntricos terem passado por eventos sucessivos de fusão cêntrica e inversão pericêntrica. Neste trabalho, o autor constata heteromorfismos de naturezas diferentes tanto em *Allonemobius* quanto em *Neonemobius palustris*. Assim, os caracteres cariotípicos analisados são propostos para embasar a separação dos três gêneros, com a proposição de que *Eunemobius* constitua uma condição mais derivada e *Neonemobius* uma outra mais primitiva no grupo.

Desde então, pouca informação foi agregada e a situação é totalmente incipiente se considerarmos a região Neotropical, onde apenas os trabalhos de Mesa & Ribas (1996) e Mesa et al. (1999) documentam o cariótipo de duas espécies do Brasil, *Phoremia circumcincta* ($2n\♂=21$) e *Phoremia nigrofasciata* ($2n\♂=17$). Os autores relatam a

ocorrência de um heteromorfismo estrutural no quinto par de autossomos de *P. nigrofasciata* e a ocorrência de uma região heteropicnótica negativa nos braços menores de um par de autossomos de *P. circumcincta*. Nestes casos, o mecanismo de determinação do sexo encontrado também foi do tipo XX (fêmeas)-XO (machos).

Como constatado, a maioria dos trabalhos em citogenética nesta subfamília, são relativamente antigos e o que se ressalta é que o grupo carece de um reexame taxonômico crítico para um entendimento mais coeso de suas relações (MESA, com. pes.).

3. ESTUDOS CITOGENÉTICOS POR COLORAÇÃO DIFERENCIAL

Em determinados grupos de Orthoptera, especialmente dentre os Acrididae, várias metodologias têm sido empregadas com o objetivo de esclarecer pontos difíceis de se diagnosticar pela citogenética convencional. Em grilos, contudo, tal emprego já não tem sido amplamente observado.

O bandamento-C, por exemplo, que evidencia a distribuição de heterocromatina constitutiva, tem sido facilmente obtido em cromossomos de Orthoptera. De acordo com Verma & Babu (1995), as técnicas de bandamento-C produzem uma marcação seletiva da heterocromatina constitutiva nos cromossomos e no núcleo. Tais marcações podem variar significativamente em tamanho entre os homólogos, tanto em um mesmo indivíduo como entre indivíduos diferentes. Sendo assim, as bandas-C de todos os cromossomos podem ser virtualmente consideradas heteromórficas (MCKENZIE & LUBS, 1975; VERMA & DOSIK, 1980 apud VERMA & BABU, 1995). Além disso, translocações envolvendo regiões de heterocromatina constitutiva podem ser detalhadamente identificadas quanto aos pontos precisos de fissão e quanto à estimativa de posição da região centromérica.

Comparações interespecíficas dos padrões de bandamento-C revelaram, por exemplo, diferenças de padrões entre gêneros diferentes e até entre espécies de um mesmo gênero de acrídeos (SANTOS et al., 1983). Essas variações interespecíficas são verificadas provavelmente em função da natureza dinâmica da heterocromatina (MORESCALCHI, 1977 apud SANTOS et al., 1983), mostrando-se assim uma ferramenta simples, mas

imprescindível em vários casos. Discute-se, por outro lado, que as relações evolutivas entre diferentes *taxa* são muito complexas para serem deduzidas apenas por padrões de bandamento-C, já que os mesmos podem mudar tão rapidamente e não servem como marcadores evolutivos sensíveis (CABRERO & CAMACHO, 1986).

Nankivell (1976), por exemplo, comparou quatro espécies do grupo *crenaticepes* do gênero *Atractomorpha* (Acridoidea, Pyrgomorphidae), relatando diferenças marcantes na quantidade de heterocromatina constitutiva entre elas. Constatou a existência de polimorfismo quanto ao comprimento do segmento heterocromático em populações de *A. similis*, com pelo menos seis e até dez extremidades cromossômicas polimórficas. Analisando indivíduos híbridos verificou também que a variabilidade em segmentos heterocromáticos não diferia muito com relação aos indivíduos de uma única população devido ao grande número de polimorfismos locais presentes em cada uma dessas populações.

Casos como os citados acima têm revelado-se constantes dentre os Caelifera, principalmente em razão da maior intensidade de estudos. Comentando sobre a importância do assunto, Shaw et al. (1976) propuseram uma nomenclatura relativamente ampla de acordo com a quantidade e distribuição da heterocromatina nos cromossomos. Neste trabalho sobre distribuição de heterocromatina constitutiva em quatro raças de gafanhotos *Caledia captiva*, os autores comentam também o fato de a redistribuição de bandas-C entre acrocêntricos e metacêntricos ter ocorrido por inversões pericêntricas nas quatro raças. Além disso, procuram explicar também a ocorrência de bandas intersticiais e terminais que, provavelmente devem ter surgido por algum tipo de duplicação saltatória de seqüências pré-existentes nos cromossomos.

Se pensarmos nessas variações e tomarmos como exemplo uma dada espécie ou mesmo espécies distintas, verificaremos que os homólogos podem ser polimórficos e diferir em número, tamanho e distribuição da heterocromatina constitutiva. Nos casos em que há diferenças na quantidade de material heterocromatínico, isto pode ser resultado de eventos de adição ou deleção. Contudo, quando bandas-C adicionais estão presentes, provavelmente devem apresentar uma tendência a substituir as regiões eucromáticas do complemento padrão ou constituir vantagens genuínas para o complemento eucromatínico normal.

Quando há ocorrência de rearranjos estruturais envolvendo regiões de banda-C, estas permanecem comumente preservadas quanto à sua forma característica. Em outros casos, ainda, bandas-C adicionais podem surgir como consequência de rearranjos estruturais (JOHN & KING, 1977).

Seguindo a necessidade de se entender algo mais sobre o papel e dinâmica da heterocromatina constitutiva no complemento cromossômico, John & King (1982) discutiram também sobre os efeitos meióticos da heterocromatina supernumerária na espécie australiana *Heteropternis obscurella* (Acridoidea). Neste caso, a variação quanto à presença ou tamanho de blocos heterocromáticos entre os autossomos homólogos figura como uma das categorias mais comuns de polimorfismo em populações naturais. Em alguns casos, estes estão associados também a efeitos dramáticos na distribuição de quiasmas em bivalentes que sejam homozigotos ou heterozigotos para a presença de segmentos supernumerários (JOHN, 1973; MIKLOS & NANKIVELL, 1976; JOHN, 1981 apud JOHN & KING, 1982). A ocorrência de novos blocos de heterocromatina pode exercer também efeitos pronunciados nos modos de associação intra e intercromossômicos durante a meiose, dependendo diretamente das características dos quiasmas no sistema e do tipo de material heterocromatínico em questão.

O trabalho de Cabrero & Camacho (1986) também aborda tais questões dentre os acrídeos quando da caracterização dos padrões de bandamento-C em diversas espécies de Gomphocerinae. Neste caso, vale ressaltar que os resultados encontrados vinham de encontro ao modelo eqüilocal de distribuição da heterocromatina constitutiva (HEITZ, 1933; 1935 apud CABRERO & CAMACHO, 1986), em que se postulava que esta tende a estar localizada em *loci* similares em cromossomos não-homólogos de um mesmo complemento diplóide. No entanto, os autores argumentam que esses blocos heterocromáticos não coincidem necessariamente em tamanho e/ou composição. Tal tendência pronunciada de variação da heterocromatina constitutiva em gafanhotos tem sido evidenciada também por diversos autores (JOHN & KING, 1977; 1982; 1983; HEWITT, 1979; SANTOS et al., 1983; CAMACHO et al., 1984; SHAW et al., 1976).

Outros estudos relevantes em Orthoptera foram conduzidos em relação à caracterização de padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva em acrídeos e

tetigónídeos, dentre os quais, pode-se citar os de Bugrov et al. (1994), Bugrov & Warchałowska-Śliwa (1997), Bugrov & Warchałowska-Śliwa (2002), Bugrov et al. (2004), Warchałowska-Śliwa & Bugrov (1996, 1997, 1998), Warchałowska-Śliwa & Heller (1998), Warchałowska-Śliwa & Maryńska-Nadachowska (1995), Warchałowska-Śliwa et al. (1994a), Warchałowska-Śliwa et al. (2001), Warchałowska-Śliwa et al. (2003).

Em grilos, são poucos os trabalhos relacionados, podendo-se citar os de Drets & Stoll (1974), Warchałowska-Śliwa et al. (1978) e, mais recentemente, os de Mesa & Ribas (1996), Zefa & Mesa (1997), Fontanetti et al. (1998), Passetti (1999) e David et al. (2002).

Regiões de interesse nos cromossomos também podem ser detectadas a partir de técnicas citogenéticas específicas como, por exemplo, a análise de região organizadora de nucléolo (RON), que contém os principais sítios de síntese de RNAr e de formação do nucléolo. As metodologias mais empregadas são a de impregnação por íons prata (Ag^+ RON) e a hibridização *in situ* com fluorocromos com sondas de DNAr (FISH). O que distingue as duas técnicas é que a RON baseia-se não nas propriedades do DNA como ocorre na hibridização *in situ*, mas nas propriedades das proteínas ácidas produzidas durante a intérfase e acumuladas em torno da RON (SCHWARZACHER et al., 1978 apud SÁNCHEZ et al., 1995). Sua importância em estudos evolutivos deve-se ao fato de detectarem, ao nível molecular, genes de RNAr presentes em uma ou várias regiões organizadoras de nucléolo, identificando marcadores evolutivos dinâmicos, ou seja, espaçadores não transcritos (LÓPEZ-LEÓN et al., 1995).

Como comentam Zurita et al. (1997), diversos autores sugeriram algum tipo de associação entre a impregnação por prata e a atividade transcricional de genes ribossômicos durante a intérfase (HOWELL, 1977; HUBBELL, 1985 apud ZURITA et al., 1997). Esta hipótese foi, contudo, refutada por outros (RAMAN & SPERLING, 1981; MEDINA et al., 1983 apud ZURITA et al., 1997), que defendem a idéia de que a impregnação por prata requer apenas um estado descondensado da cromatina da RON para ocorrer. Outro estudo (JIMÉNEZ et al., 1988) demonstrou que a descondensação das RON's é necessária, mas não suficiente para que ocorra a impregnação por prata e sugeriram que a atividade transcricional precedente também é imprescindível. Posteriormente, variações intra e interindividuais consideráveis, tanto em tamanho quanto em número de RON's, foram

relatadas em diversas espécies animais (SCHIMID, 1982; SÁNCHEZ et al., 1989, 1990; SUZUKI et al., 1990), o que poderia ser interpretado como uma consequência de diferenças nas necessidades de RNAr pelas células na intérfase precedente (SÁNCHEZ et al., 1989).

De fato, deve existir um padrão de distribuição das RON's mais freqüente entre espécies relacionadas e alterações nesse padrão podem ser indicativas de rearranjos cromossômicos nem sempre evidentes através de coloração convencional. No caso de grilos, por exemplo, a análise de RON's foi utilizada na comparação de algumas espécies de grilos do gênero *Endecous* (ZEFA, 2000), na caracterização citogenética de quatro espécies de *Anurogryllus* (GARCÍA, 2000) e nos trabalhos de caracterização de espécies do gênero *Gryllus* (FONTANETTI et al., 1998; PASSETTI, 1999; DAVID et al., 2002).

Se, por um lado, tal panorama apresenta-se reduzido em estudos relacionados a grilos, a análise comparativa de RON's tem sido consideravelmente empregada no estudo intra e interespecífico de gafanhotos e tetigonídeos. Bridle et al. (2002), por exemplo, utilizaram a impregnação por prata para avaliar a condição de atividade ou inatividade de diferentes *clusters* de DNAr em *Chortippus brunneus* e *C. jacobsi* (Acrididae), encontrando em ambos, quatro RON's ativas em regiões pericentroméricas. Neste caso, os autores fazem uso de tais evidências para traçar um paralelo evolutivo a partir da inativação de seqüências de DNAr dessas espécies de zona híbrida como resultado do sistema regulador de expressão da RON, de forma que as seqüências em si mantêm a capacidade de expressão sob certas condições.

Outras contribuições importantes em Orthoptera quanto à caracterização dos padrões de RON, geralmente em conjunto com o bandamento-C, foram as de Warchałowska-Śliwa et al. (1992), Warchałowska-Śliwa et al. (1993), Warchałowska-Śliwa et al. (1994a; b), Warchałowska-Śliwa & Maryńska-Nadachowska (1992), Warchałowska-Śliwa & Maryńska-Nadachowska (1995), Warchałowska-Śliwa & Kostia (1996).

Mais recentemente, muitos outros trabalhos têm procurado integrar diversas ferramentas citogenéticas em análises cariotípicas. Como amostra disto, pode-se citar o estudo de cinco espécies da subfamília Leptysminae (Acrididae) onde se apresentam as caracterizações de heterocromatina constitutiva e distribuição da RON, bem como a

coloração diferencial por fluorocromos AT e CG específicos (ROCHA, et al., 2004). Souza et al. (2003) também apresentaram a descrição desses parâmetros comparados com técnica de hibridização *in situ* por fluorocromos (FISH) no gafanhoto *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae).

Deste modo, análises integradas deste tipo têm demonstrado que as regiões organizadoras de nucléolo dos Orthoptera em geral apresentam uma estrutura rica em bases GC, como pôde ser constatado também em duas espécies do gênero *Dociostaurus* (IÑIGO et al., 1993), na caracterização cromossômica de *Gryllus assimilis* (FONTANETTI et al., 1998), no proscopídeo *Stiphra robusta* (SOUZA & MOURA, 2000), no Romaleidae *Phaeoparia megacephala* (PEREIRA & SOUZA, 2000) e no Leptysminae *Belosacris* (LORETO & SOUZA, 2000).

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Exemplares de *Zucchiella* foram coletados manualmente durante o dia, em diversas oportunidades, em três localidades distintas, como seguem:

- a) **Fazenda Capricórnio, Ubatuba, SP (23°23'21''S / 45°04'31''W)**, 26.VIII.1996, A. Mesa, P.C. García, C.F. Sperber, C.C. Ribas – 1 macho. *Idem*, 06.X.1996, A. Mesa, P.C. García – 2 machos. *Idem*, 05.XI.1996, A. Mesa, P.C. García – 1 macho. *Idem*, 22.VII.1999, A. Mesa, E. Zefa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 4 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 05.IX.1999, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 21.V.2000, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 21.XI.2001, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 5 fêmeas. *Idem*, 22.I.2003, C.B. Portugal – 1 macho e 1 fêmea. *Idem*, 09.VII.2003, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 23.VIII.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 7 machos e 5 fêmeas. *Idem*, 09.IV.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 15 machos e 2 fêmeas.
- b) **Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, São Luiz do Paraitinga, SP (23°21'33''S / 45°17'41''W)**, 22.VII.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 3 machos e 1 fêmea. *Idem*, 23.V.2000, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 3 machos e

2 fêmeas. *Idem*, 20.I.2003, C.B. Portugal, J.A.O. David – 4 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 28.III.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 7 fêmeas. *Idem*, 09.VII.2003, C.B. Portugal – 3 fêmeas. *Idem*, 22.VIII.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho e 6 fêmeas. *Idem*, 09.IV.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 3 macho e 16 fêmeas.

- c) Reserva da Universidade Estadual Paulista, Corumbataí, SP (22°14'29''S / 47°41'18''W),** 11.V.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 macho. *Idem*, 09.VI.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 macho. *Idem*, 30.VII.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 11.IX.1999, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 fêmea. *Idem*, 18.IX.1999, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 04.IX.2000, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho. *Idem*, 07.IX.2000, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho. *Idem*, 28.VIII.2001, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 5 machos. *Idem*, 13.IX.2001, A. Mesa, C.B. Portugal – 2 machos e 1 fêmea. *Idem*, 15.IX.2002, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 fêmeas. *Idem*, 31.X.2003, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 13.XI.2003, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 15.III.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho e 6 fêmeas. *Idem*, 01.V.2004, C.B. Portugal – 7 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 24.VI.2004, C.B. Portugal – 2 machos e 5 fêmeas.

2. MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para a obtenção de preparações cromossômicas mitóticas foram utilizados indivíduos machos e fêmeas, preferencialmente pré-adultos e adultos jovens, submetidos a tratamento prévio *in vivo* por solução de colchicina 0,05% por um período de duas a três horas. Os exemplares foram dissecados em solução fisiológica para insetos e os cecos gástricos e ovários imediatamente transferidos para solução hipotônica KCl 0,075M em recipiente esterilizado por 7 minutos. Os tecidos foram acondicionados em microtubos

(1,5mL) contendo solução Carnoy I (solução 3:1 de metanol e ácido acético, respectivamente) e acondicionados juntamente com o exemplar a -20°C .

Para a obtenção de lâminas para análise citogenética obedeceu-se ao seguinte protocolo:

- Transferir o material fixado para lâmina escavada contendo ácido acético 45% por 5 minutos;
- dissociar o tecido com pinça e estilete na própria lâmina escavada;
- transferir o conteúdo obtido com auxílio de uma pipeta *Pasteur* ou micropipeta para um microtubo, realizando repetidas sucções com a própria pipeta para melhor dissociação;
- submeter o material a centrifugação de 1500 rpm durante 6 minutos;
- eliminar parte do sobrenadante, acrescentar fixador Carnoy I fresco e submeter novamente a centrifugação;
- repetir o procedimento, re-suspender o material e gotejar sobre lâmina (lavada em metanol P.A.) sobre banho-maria a 60°C , retirando-a logo em seguida;
- após 24 horas, corar com solução Giemsa 3% por 5 minutos.

2.2. BANDAMENTO-C (SEGUNDO SUMNER, 1972, COM MODIFICAÇÕES)

Para a caracterização do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, utilizaram-se lâminas preparadas há pelo menos sete dias, segundo o procedimento a seguir:

- Incubar a lâmina em solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, por 20 minutos; lavar em água destilada;
- mergulhar a lâmina em solução de hidróxido de bário octahidratado 5% a 60°C por 5 segundos;
- lavar em banho rápido de HCl 1N a 60°C e novamente em água destilada;
- incubar a lâmina em 2xSSC (pH=7,0) a 60°C por até 30 minutos e, em seguida, lavar em água destilada.
- Corar com solução Giemsa 3% por 20 minutos.

2.3. IMPREGNAÇÃO POR NITRATO DE PRATA (SEGUNDO HOWELL & BLACK, 1980, COM MODIFICAÇÕES)

Para a identificação das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação por nitrato de prata (Ag^+RON) as lâminas foram submetidas ao seguinte tratamento:

- adicionar uma gota de solução coloidal reveladora e duas gotas de nitrato de prata 50% sobre o material e recobrir com lamínula;
- incubar em câmara úmida a 60°C durante 2 minutos;
- lavar em água destilada;
- corar em solução Giemsa 3% durante 1 minuto.

2.4. COLORAÇÃO SIMULTÂNEA POR FLUOROCROMOS AT E CG ESPECÍFICOS, DA/CMA₃/DAPI (SEGUNDO SCHWEIZER, 1980)

- Colocar 120µL de distamicina (DA) 0,3mg/mL sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar no escuro por 15 minutos;
- retirar a lamínula e lavar sob jato d'água por 1 minuto;
- colocar a lâmina em tampão McIlvaine por 5 minutos, secando levemente em seguida;
- colocar 120µL de cromomicina A₃ (CMA₃) 0,1mg/mL sobre a lâmina, cobrir com lamínula e deixar por 1 hora no escuro;
- lavar sob jato d'água durante 1 minuto;
- colocar em tampão McIlvaine por 5 minutos, secando levemente em seguida;
- colocar as lâminas em cubeta com DAPI (0,2µg/mL) durante 15 minutos, em escuro;
- lavar a lâmina sob jato d'água, passar novamente por tampão;
- montar a lâmina com solução de glicerol e armazenar no escuro por pelo menos 20 dias.

2.5. DOCUMENTAÇÃO

Todos os resultados obtidos foram documentados em fotomicroscópio Zeiss com objetiva de imersão e filtro verde.

Utilizou-se filme fotográfico ImageLink (ISO 100), revelado em Dektol diluído em água (1:1) e fixado em F5, de acordo com especificações da Kodak. As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodabrome Print RC-F3 (Kodak), revelado em Dektol diluído em água (1:2) e fixado em F5.

2.6. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

A montagem dos cariótipos foi estabelecida de acordo com tamanho e morfologia dos cromossomos, sendo dispostos em ordem decrescente de tamanho e aos pares. Os pares de autossomos foram tentativamente pareados e numerados.

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com White (1973), sendo classificados em metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) ou acrocêntricos (A).

IV. RESULTADOS

Com os resultados obtidos foram elaborados dois artigos, que estão em fase de envio para publicação.

- **Artigo I:** “Chromosomes of *Zucchiella atlantica* Mello, 1990 (Orthoptera, Trigonidiidae) into an overview of the Nemobiinae crickets.” – A ser enviado para a revista Neotropical Entomology.
- **Artigo II:** “Caracterização cromossômica por coloração convencional e diferencial de três populações de grilos *Zucchiella atlantica* Mello, 1990 (Trigonidiidae, Nemobiinae) do Brasil.” – A ser enviado para a revista Folia Biologica.

ARTIGO I: Chromosomes of *Zucchiella atlantica* Mello, 1990 (Orthoptera: Trigonidiidae) into an overview of the Nemobiinae crickets.

Portugal, C. B. & Mesa, A.

KEY WORDS: cytogenetics, Grylloidea, karyotype, meiosis, ground crickets.

ABSTRACT

Few works have been published on cytogenetics of Nemobiinae crickets. Within the Neotropical region the karyotypes of only two species are known, both of them belonging to the genus *Phoremia*. In the present paper, the chromosomes of a third species, *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, are studied and a cytological review of the known karyotypes of species of that subfamily presented. The mentioned species shows $2n_{\text{♂}}=23$ and $2n_{\text{♀}}=24$ with an XO (males)-XX (females) sex determining mechanism and a structural polymorphism in the fifth pair. This chromosome number suggests a plesiomorphic condition within the subfamily since in the species studied until now the diploid number ranges from $2n=7$ to $2n=21$. In Orthoptera those species with high chromosome numbers tend to reduce its numbers by means of centric fusions rather than to increase them, due to difficulties in the availability of new centromeres.

INTRODUCTION

The order Orthoptera includes the superfamily Grylloidea with several families, among them the Trigonidiidae, which has been divided into two subfamilies: Trigonidiinae and Nemobiinae. The last one aggregates six tribes, with three of them (Hemigryllini, Nemobiini and Pteronemobiini) represented by several species in the Neotropical region. The genus *Zucchiella* (with its single species *Z. atlantica*) was described by Mello (1990) and included by this author in the tribe Nemobiini due to the absence of a specialized glandular spur on the male hind tibiae. *Zucchiella atlantica* is a small wingless species, living preferentially in dense and shaded leaf litter of atlantic rain forests, in the regions of Ubatuba and Caraguatatuba (São Paulo State, Brazil).

Several papers have been published on the chromosomes of Nemobiinae species, the majority of them from Asia and North America. From the Neotropical region only two species of the genus *Phoremia* were citologically analyzed (Mesa and Ribas, 1996; Mesa *et al.*, 1999). In such case, from 51 genera actually placed in the Nemobiinae, only nine of them have been partially analysed from the cytogenetical point view.

The present paper deals with the study of mitotic and meiotic chromosomes of *Z. atlantica* as well as with a revision on the already known karyological information in other species of its subfamily.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *Z. atlantica* were handly collected at Capricórnio Farm, Ubatuba, São Paulo State (23°23'21''S - 45°04'31''W). Nymphs and adults were easily obtained from the leaf litter of an abandoned cacao plantation during day time at different opportunities as follows: Brazil (SP), Ubatuba, Fazenda Capricórnio, 26.VIII.1996, A. Mesa, P. García, C.F. Sperber, C. C. Ribas - 1 male. *Idem*, 06.X.1996, A. Mesa, P. García - 1 male. *Idem*, 05.XI.1996, A. Mesa, P. García - 2 males. *Idem*, 05.IX.1999, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi - 2 males. *Idem*, 22.VII.1999, A. Mesa, E. Zefa, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi - 6 males and 3

females. *Idem*, 21.V.2000, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi – 5 males. *Idem*, 21.XI.2001, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi – 6 females. *Idem*, 21.XI.2001, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi – 4 females. *Idem*, 09.VII.2003, C. B. Portugal – 1 male. *Idem*, 22.I.2003, C. B. Portugal – 1 male and 1 female. *Idem*, 23.VIII. 2003, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi – 8 males and 5 females. *Idem*, 09.IV.2004, C. B. Portugal, A. R. Miyoshi – 10 males and 2 females. An amount of 37 males and 21 females were analysed.

Meiotic cells were obtained from testes and the mitotic ones from cecae and ovarium tissues of colchicined (0,05% in insect physiological solution) specimens. Tissues were fixed and preserved in Carnoy I (3:1, ethanol: acetic acid) at -20°C for further analysis. Material was softened and cells dispersed in 45% acetic acid, then submitted at centrifugation and refixation twice after discarding the supernatant medium. Suspended cells were dropped on clean slides on water bath at 60°C and stained with 3% Giemsa solution after 24 hours old.

Chromosomes morphology was determined according to that suggested by White (1973).

RESULTS AND DISCUSSION

The chromosome number of *Z. atlantica* is $2n\sigma=22+XO$ and $2n\varphi=22+XX$ (**fig. 1A**). Chromosomal morphology was determined as follows: the pairs 2, 4, 5, 6, 8 and 10 are submetacentric, the pairs 1, 3, 7, 9 and 11 are acrocentric and the sex chromosome is metacentric. No grouping of the autosomes is possible because they decrease gradually in size. Pair 5 is a heteromorphic one and its two conditions appear as an intra-individual variation (see box in **fig 1A**) in males as much as in females. The sex chromosome is evidently the largest of the complement. At meiosis, the bivalents form one, two or three chiasmata from diplotene stage to the first metaphase (**fig. 1A, 1B and 1C**).

Among more than fifty genera placed in the subfamily Nemobiinae, 31 species belonging to nine genera have been cytologically studied. Most of them were removed to other genera after the original publication. An updated taxonomical identification of these

species is shown in **table 1** according to the catalogue of Otte *et al.* (2001), as well as available karyological information.

The diploid number in 31 nemobine species studied by several authors ranges from $2n\sigma=7$ to $2n\sigma=21$, with the following percentage: three species (9,7%) with $2n\sigma=7$, one species (3,2%) with $2n\sigma=11$, ten species (32,3%) with $2n\sigma=15$, nine species (29,0%) with $2n\sigma=17$, seven species (22,6%) with $2n\sigma=19$ and one species with $2n\sigma=21$ (3,2%). The XO (males)- XX (females) sex determining mechanism is the same in all the species studied. Karyotypes of only two species were, so far reported for the Neotropical region by Mesa *et al.* (1999), namely *Phoremia circumcincta* ($2n\sigma=17$) and *P. nigrofasciata* ($2n\sigma=21$).

Trends in many Orthoptera species are to reduce rather than increasing the chromosomal number. *Zucchiella atlantica* presents the highest chromosome number within the Nemobiinae and this condition could be interpreted as a plesiomorphic condition in the group.

Polymorphisms for structural rearrangements in Nemobiinae involving autosomes were already mentioned for the following species: *Allonemobius g. griseus* (Davenport, 1960; Lim, 1971), *Dianemobius (Polionemobius) taprobanensis* (Lim, 1971; Manna & Bhattacharjee, 1964), *Eunemobius c. carolinus* (Davenport, 1960; 1986; Lim, 1971), *Nemobius yezoensis* (Ohmachi, 1927a; 1935), *Pteronemobius nigrofasciatus* (Ohmachi 1927a; Tateishi, 1932). For the Neotropical fauna Mesa *et al.* (1999) reported the occurrence of a heteromorphism involving the fifth pair of autosomes in *Phoremia nigrofasciata*.

The occurrence of structural heteromorphisms, like pericentric inversions and fissions, is usually known in crickets on the whole. Meanwhile in *Z. atlantica* we find only two supposed conditions of homozygosis and heterozygosis as an intra-individual variation. Theoretically, it makes uncertain that it could be related with a case of structural heteromorphism implying a pericentric inversion, for example. If it is true, in such case it should be unlikely the existence of an intra-individual variation. On the other hand, there should occur three different karyotypes instead of two here identified, despite the relative low amount of specimens studied.

In the light of such evidences we suppose that the heteromorphism found in *Z. atlantica* should be related with another kind of variation, perhaps with differential activity or

chromatin quantity. Future researches, specially that of differential cytogenetical analysis, could help to clear up these questions and possibly add some new information on our views of the karyotypical evolution of the group.

ACKNOWLEDGMENTS

We deeply thank the valuable comments and revisions made on the manuscript by Dr. Carmem S. Fontanetti. We are also grateful to Dr. Doralice M. Cella for her suggestions and to Akio R. Miyoshi for helping on the collecting trips.

LITERATURE CITED

- BAUMGARTNER, W. J. Die Spermatogenese bei einer Grille *Nemobius fasciatus*. **Zellforsch Mikroskop. Anat.**, v. 9, p. 603-639, 1929.
- DAVENPORT, R. **The cytotaxonomy of the genus *Nemobius* (Orthoptera: Gryllidae: Nemobiinae)**. Ph.D. dissertation, The John Hopkins Univ., Baltimore, Maryland, 1960.
- DAVENPORT, R. Chromosomal polymorphism and speciation in the genus *Eunemobius* (Orthoptera: Grylloidea). **Genetica**, Dordrecht, v. 68, p. 105-107, 1986.
- FAVRELLE, M. Contribution a l'étude de la garniture chromosomique des orthoptères (Gryllidae et Tettigoniidae). **Ann. Mus. R. Hist. Nat. de Belg.**, Bruxelles, v. 10, n. 3, p. 53-60, 1936.
- HONDA, H. The chromosome numbers and the multiple chromosomes in Gryllinae. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo, v. 2, n. 10, p. 562-564, 1926.
- LIM, H. C. Note on the chromosomes of the Nemobiinae (Gryllidae). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 49, p. 391-395, 1971.
- MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. Studies of gryllid chromosomes. II. Chromosomal polymorphisms in *Pteronemobius taprobanensis* (Walk.) and chromosome morphology of *Loxoblemmus* sp. **Cytologia**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 196-206, 1964.

- MELLO, F. A. G. A new genus and species of nemobiine cricket from the brazilian atlantic forest (Orthoptera, Gryllidae, Nemobiinae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 569-571, 1990.
- MESA, A.; RIBAS, C.C. Karyology of a new species of the genus *Phoremia* (Grylloidea, Nemobiinae). **Braz. J. Genet.**, Ribeirão Preto, Suppl., v. 9, n. 3, p. 120, 1996.
- MESA, A.; RIBAS, C. C.; GARCÍA, P. *Phoremia nigrofasciata* and *P. circumcincta*: two new species of cricket of the subfamily Nemobiinae (Orthoptera, Grylloidea, Trigonidiidae). **J. Orthoptera Res.**, Philadelphia, v. 8, p. 59-64, 1999.
- OHMACHI, F. Preliminary note on cytological studies on Grylloidea: chromosome numbers and sex chromosome of eighteen species. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo v. 3, p. 451-456, 1927a.
- OHMACHI, F. Preliminary note on a new system in the classification of Grylloidea. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo v. 3, n. 7, p. 457-460, 1927b.
- OHMACHI, F. A comparative study of chromosome complements in the Grylloidea in relation to taxonomy. **Bull. Mie Imp. Coll. Agr. For.**, v. 5, p. 1-48, 1935.
- OHMACHI, F. A list of the chromosome numbers in the Grylloidea. **Tsue**, p. 1-6, 1951.
- OTTE, D.; EADES, D.C.; NASKRECKI, P. 2001. **Orthoptera Species File** on Line, v.2.2. Disponível em < <http://osf2x.orthoptera.org/OSF2.2/OSF2X2Frameset.htm> >. Acesso em 10 mar. 2005.
- TATEISHI, S. Preliminary report on the chromosomes of several species of Grylloidea from Formosa. **Zool. Mag.**, Tokyo, v. 44, p. 10-13, 1932.
- VICKERY, V. R.; JOHNSTONE, D. E. Generic status of some Nemobiinae (Orthoptera: Gryllidae) in North America. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, College Park, v. 63, n. 6, p. 1740-1749, 1970.
- VICKERY, V. R.; WEISSMAN, D. B. *Neonemobius eurynotus* (Rehn and Hebard) (Grylloptera: Trigonidiidae: Nemobiinae), a cricket of the San Francisco Bay area, California. **Pan-Pac. Entomol.**, San Francisco, v. 65, n. 01, p. 68-73, 1989.
- WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1973. 961 p.

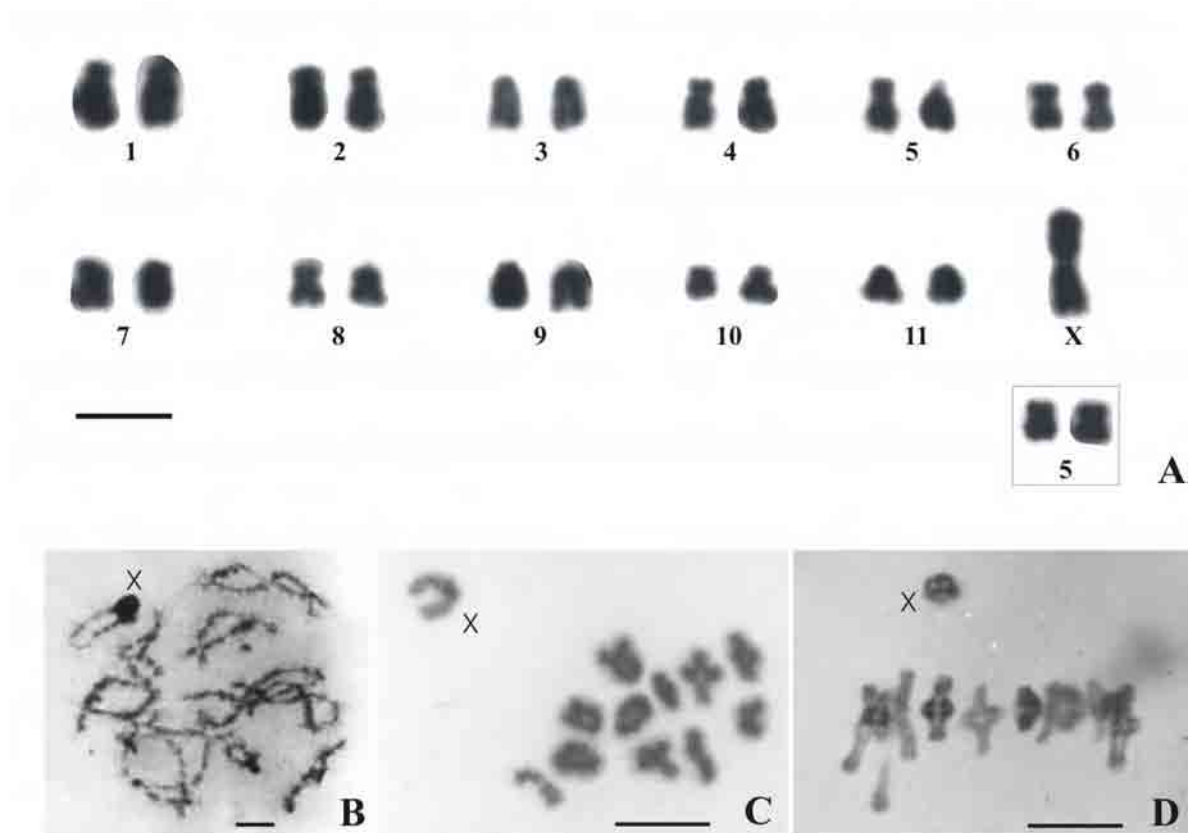


Figure 1: Chromosomes of *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, $2n=23$, XO (males) - $2n=24$, XX (females). (A) Male karyotype. Box showing the heteromorphic pair 5. (B, C) Diplotene. (D) First metaphase. Enlargements: 10 μ m.

Species	2n?	Autosomes morphology (pair of homologues)	Authors
<i>Allonemobius allardi</i> (Alexander & Thomas, 1958)	15	7A	Davenport (1960); Lim (1971)
<i>Allonemobius griseus griseus</i> (Scudder, 1877)	15	7A _{1,2}	Davenport (1960); Lim (1971)
<i>Allonemobius fasciatus</i> (De Geer, 1773)	15	7A	Honda (1926); Baumgartner (1929); Davenport (1960); Lim (1971)
<i>Allonemobius maculatus</i> (Blatchley, 1900)	15	7A	Davenport (1960)
<i>Allonemobius tinnulus</i> (Fulton, 1931)	15	not available	Davenport (1960)
<i>Dianemobius chibae</i> (Shiraki, 1911)	15	not available	Ohmachi (1927a)
<i>Dianemobius (Dianemobius) csikii</i> (Bolivar, 1901)	17	not available	Honda (1926); Ohmachi (1935)
<i>Dianemobius (Dianemobius) fascipes</i> (Walker, 1869)	17	not available	Ohmachi (1927a, 1935); Tateishi (1932)
<i>Dianemobius (Dianemobius) furumagiensis</i> (Ohmachi & Furukawa, 1929)	19	7A + 2M	Ohmachi (1929, 1935)
<i>Dianemobius mikado</i> (Shiraki, 1911)	15	2A + 5M	Ohmachi (1927a, 1935); Manna & Bhattacharjee (1964)
<i>Dianemobius (Polionemobius) flavoantennalis</i> (Shiraki, 1911)	17	6A + 2SM	Ohmachi (1929, 1935)
<i>Dianemobius (Polionemobius) taprobanensis</i> (Walker, 1869)	15	2A ₁ + 1SM ₁ + 4M	Lim (1971); Manna & Bhattacharjee (1964)
<i>Eunemobius carolinus carolinus</i> (Scudder, 1877)	7	3M _{1,2}	Davenport (1960, 1986); Lim (1971)
<i>Eunemobius confusus</i> (Blatchley, 1903)	7	3M	Davenport (1960, 1986); Vickery & Johnstone (1970)
<i>Eunemobius melodius</i> (Thomas & Alexander, 1957)	7	2SM + 1M	Davenport (1960, 1986)
<i>Nemobius sylvestris</i> (Bosc, 1792)	17	5A + 3M	Favrelle (1936)
<i>Nemobius yezoensis</i> Shiraki (?)	17	7A + 1A-SM ₁	Ohmachi (1927a, 1935, 1951)
<i>Neonemobius variegatus</i> (= <i>bruneri</i>) (Bruner, 1893)	19	8A + 1M	Davenport (1960)
<i>Neonemobius cubensis</i> (Saussure, 1874)	19	9A	Davenport (1960)
<i>Neonemobius eurynotus</i> (Rehn & Hebard, 1918)	19	9A	Vickery & Weissman (1989)
<i>Neonemobius palustris</i> (Blatchley, 1900)	19	9A	Davenport (1960); Lim (1971)
<i>Phoremia circumcincta</i> Mesa & Garcia, 1999	17	7A+1M	Mesa et al. (1999)
<i>Phoremia nigrofasciata</i> Mesa & Ribas, 1999	21	8A+2SM	Mesa et al. (1999)
<i>Pictonemobius</i> sp.	19	not available	Vickery & Johnstone (1970)
<i>Pteronemobius (Pteronemobius) birmanus</i> (Chopard, 1918)	15	not available	Lim (1971)
<i>Pteronemobius (Pteronemobius) nigriscens</i> (Shiraki, 1911)	17	not available	Ohmachi (1939)
<i>Pteronemobius (Pteronemobius) nigrofasciatus</i> (Matsumura, 1904)	17	5A + 2SM + 1A-SM ₁	Ohmachi (1927a); Tateishi (1932)
<i>Pteronemobius (Pteronemobius) nitidus</i> (Bolivar, 1901)	17	not available	Lim (1971)
<i>Pteronemobius (Pteronemobius) ohmachi</i> (Shiraki, 1930)	11	5M	Ohmachi (1927a, 1935)
<i>Stenonemobius (Ocellonemobius) bicolor</i> (Saussure, 1877)	19	not available	Lim (1971)
<i>Scottiola</i> sp. (Bolivar, 1912)	15	not available	Lim (1971)

Table 1: List of Nemobiinae crickets cytologically studied.

Taxa according to Orthoptera Species File on Line (v.2.2) showing male diploid number and autosomes morphology. XX/XO is the only sex determining mechanism in the group.

(M) metacentric, (SM) submetacentric, (A) acrocentric. ¹Structural heteromorphism.

²Kind of heteromorphism not described. ³*Nemobius yezoensis* is not mentioned at Orthoptera Species File on Line (2001).

ARTIGO II: Caracterização cromossômica por coloração convencional e diferencial de três populações de grilos *Zucchiella atlantica* Mello, 1990 (Trigonidiidae, Nemobiinae) do Brasil.

Portugal, C. B., Mesa, A. & Fontanetti, C. S.

PALAVRAS-CHAVE: citogenética, RON, banda-C, fluorocromos, heteromorfismo.

RESUMO

Coloração convencional, bandamento-C, Ag⁺RON e coloração simultânea por fluorocromos CMA/DAPI foram utilizados na caracterização cromossômica de três populações de grilos do gênero *Zucchiella*. Nenhuma variação significativa foi encontrada quanto ao número ou morfologia cromossômicos. O padrão de bandamento-C revelou distribuição da heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e ao longo dos braços curtos do par 6. As RON's primárias correspondem aos braços curtos do par 6 e são ricas em bases CG (CMA₃ positivas). O par 5 é heteromórfico com variação intra-individual em todas as populações, mas um de seus homólogos apresentou um grande bloco terminal Ag⁺ e C-positivo apenas na população de Ubatuba. Este segmento Ag⁺ e C-positivo do homólogo heteromórfico do par 5 corresponde a uma RON secundária e não é rico em bases CG como as RON's primárias. Esta região cromossômica deve estar envolvida em atividade transcricional e a presença de

heterocromatina deve estar relacionada com a proteção deste segmento cromossômico e também pode estar desempenhando alguma função na desativação ocasional de genes reguladores de transcrição.

INTRODUÇÃO

Zucchiella atlantica foi inicialmente descrita para regiões de Mata Atlântica, em Ubatuba e Caraguatatuba, São Paulo, Brasil (MELLO, 1990). Mais recentemente, duas novas populações foram encontradas em regiões de cerrado (Corumbataí, SP) e a cerca de 800m de altitude na Serra do Mar (São Luiz do Paraitinga, SP) (PORTUGAL, 2002). Estes grilos da subfamília Nemobiinae ocupam regiões de serrapilheira na mata e são insetos ápteros, com comportamento gregário e que apresentam baixa vagilidade.

Considerando-se o fato de que diversas catástrofes eventuais, isolamentos e re-expansões em eras glaciais recentes promoveram a divergência cariotípica dentre os Orthoptera e que os trezentos milhões de anos ou mais nos quais se tem registro da existência desse grupo promoveram amplas oportunidades para mudanças cromossômicas, morfológicas e comportamentais (GWYNNE et al., 2001), é importante considerar a análise cromossômica, sob a aplicação de diversas técnicas, como instrumento extremamente valioso no estudo de espécies crípticas, na constatação de variabilidade cariotípica, comportamento meiótico dos cromossomos e polimorfismos.

Muitos trabalhos têm integrado diversas ferramentas citogenéticas na caracterização de regiões específicas nos cromossomos como, por exemplo, o bandamento-C, a análise de regiões organizadoras de nucléolo (RON) e a coloração diferencial por fluorocromos AT e CG específicos (DAPI/CMA). Comparações interespecíficas dos padrões de bandamento-C revelaram, por exemplo, diferenças de padrões entre gêneros diferentes de acrídeos e até entre espécies de um mesmo gênero (SANTOS et al., 1983). Por outro lado, discute-se que as relações evolutivas entre diferentes *taxa* são muito complexas para serem deduzidas apenas por padrões de bandamento-C, já que os mesmos podem mudar tão rapidamente que não servem como marcadores evolutivos sensíveis (CABRERO & CAMACHO, 1986). A análise das RON's, por outro lado, tem sugerido relevante importância em estudos

evolutivos pelo fato de detectarem ao nível molecular, essencialmente, genes de RNAr presentes em uma ou várias regiões organizadoras de nucléolo, identificando marcadores evolutivos dinâmicos, ou seja, espaçadores não transcritos (LÓPEZ-LEÓN et al., 1995). A utilização concomitante da marcação por fluorocromos tem em muito auxiliado na elucidação da constituição dessas regiões cromossômicas, bem como em tantos outros casos de variações intra e interindividuais. Em grilos, tais investigações são muito escassas, ainda mais se considerarmos estudos relativos à região neotropical.

No caso das três populações de *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, alguns resultados parciais (PORTUGAL, 2002) já levantavam a possibilidade de que estas, por apresentarem baixa vagilidade e por ocuparem ambientes bastante distintos, pudessem constituir raças cromossômicas ou mesmo espécies crípticas, indistinguíveis sob aspectos morfológicos gerais, mas que análises integradas e mais detalhadas de citogenética poderiam vir a esclarecer.

Desta forma, o presente trabalho propõe-se a caracterizar citogeneticamente três populações de *Zucchiella atlantica* de acordo com técnicas de coloração cromossômica convencional, bandamento-C, impregnação por íons prata para marcação de regiões organizadoras de nucléolo (Ag^+RON) e coloração simultânea por fluorocromos AT e CG específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os exemplares para análise citogenética foram coletados manualmente durante o dia em diversas oportunidades, em três localidades distintas, como seguem:

a) Fazenda Capricórnio, Ubatuba, SP (23°23'21''S / 45°04'31''W), 26.VIII.1996, A. Mesa, P.C. García, C.F. Sperber, C.C. Ribas – 1 macho. *Idem*, 06.X.1996, A. Mesa, P.C. García – 2 machos. *Idem*, 05.XI.1996, A. Mesa, P.C. García – 1 macho. *Idem*, 22.VII.1999, A. Mesa, E. Zefa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 4 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 05.IX.1999, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 21.V.2000, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 21.XI.2001, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 5 fêmeas. *Idem*, 22.I.2003,

C.B. Portugal – 1 macho e 1 fêmea. *Idem*, 09.VII.2003, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 23.VIII.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 7 machos e 5 fêmeas. *Idem*, 09.IV.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 15 machos e 2 fêmeas. Um total de 35 machos e 17 fêmeas foi analisado.

b) Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, São Luiz do Paraitinga, SP (23°21'33''S / 45°17'41''W), 22.VII.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 3 machos e 1 fêmea. *Idem*, 23.V.2000, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 3 machos e 2 fêmeas. *Idem*, 20.I.2003, C.B. Portugal, J.A.O. David – 4 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 28.III.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 7 fêmeas. *Idem*, 09.VII.2003, C.B. Portugal – 3 fêmeas. *Idem*, 22.VIII.2003, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho e 6 fêmeas. *Idem*, 09.IV.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 3 machos e 16 fêmeas. Um total de 14 machos e 38 fêmeas foi analisado.

c) Reserva da Universidade Estadual Paulista, Corumbataí, SP (22°14'29''S / 47°41'18''W), 11.V.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 macho. *Idem*, 09.VI.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 macho. *Idem*, 30.VII.1999, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 11.IX.1999, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 fêmea. *Idem*, 18.IX.1999, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 machos. *Idem*, 04.IX.2000, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho. *Idem*, 07.IX.2000, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho. *Idem*, 28.VIII.2001, A. Mesa, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 5 machos. *Idem*, 13.IX.2001, A. Mesa, C.B. Portugal – 2 machos e 1 fêmea. *Idem*, 15.IX.2002, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 2 fêmeas. *Idem*, 31.X.2003, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 13.XI.2003, A. Mesa, C.B. Portugal – 1 fêmea. *Idem*, 15.III.2004, C.B. Portugal, A.R. Miyoshi – 1 macho e 6 fêmeas. *Idem*, 01.V.2004, C.B. Portugal – 7 machos e 3 fêmeas. *Idem*, 24.VI.2004, C.B. Portugal – 2 machos e 5 fêmeas. Um total de 23 machos e 21 fêmeas foi analisado.

Para a obtenção de células mitóticas foram utilizados indivíduos pré-adultos e adultos jovens submetidos a tratamento prévio *in vivo* por solução de colchicina 0,05% por três horas. Os exemplares foram dissecados em solução fisiológica para insetos e os cecos gástricos e ovários imediatamente transferidos para solução hipotônica KCl 0,075M. Os tecidos foram fixados em Carnoy I e acondicionados a -20°C.

As preparações cromossômicas foram feitas por dissociação dos tecidos em ácido acético 45% e a suspensão celular submetida a centrifugação (1200 rpm). O sobrenadante foi eliminado, o volume completado com Carnoy I e o material centrifugado por mais duas vezes. As lâminas foram preparadas de acordo com Henegariu et al. (2001), com modificações.

Bandas-C foram obtidas segundo Sumner (1972), com modificações. A identificação de regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação por nitrato de prata (Ag^+RON) foi estabelecida de acordo com Howell & Black (1980), com modificações. Para a marcação diferencial por fluorocromos foi utilizada a técnica de coloração simultânea através de DA/CMA₃/DAPI segundo Schweizer (1982), com modificações.

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com a proposta de White (1973).

RESULTADOS

O número cromossômico encontrado nas três populações foi $2n=23$, XO (machos) e $2n=24$, XX (fêmeas) (**Fig. 1A, 2A e 3A**). Nos três casos, o complemento é isodiamétrico, isto é, apresenta cromossomos de tamanhos muito semelhantes, e foi organizado em ordem decrescente: os pares 2, 4, 5, 6, 8 e 10 são submetacêntricos, os pares 1, 3, 7, 9 e 11 são acrocêntricos. Sob coloração convencional, um dos homólogos do par 5 é do tipo submetacêntrico e o outro elemento apresenta morfologia variável, evidenciando uma proeminente constrição secundária em alguns casos (quadros em destaque nas **fig. 1A, 2A e 3A**). O cromossomo sexual é o maior do complemento e é do tipo metacêntrico.

A análise de bandamento-C nas três populações revelou um padrão de heterocromatina constitutiva pericentromérica em todos os cromossomos (**fig. 1B, 2B, 3B**), exceto pelo par 6, que possui os braços curtos heterocromáticos. A população de Ubatuba, além do padrão mencionado para o par 6, apresenta também um homólogo do par 5 com um grande bloco C-positivo (seta na **fig. 1B**).

A impregnação por íons prata marcou positivamente os braços curtos do par 6 nas três populações (**1C, 2C, 3C**). O autossomo heteromórfico do par 5, marcado positivamente pelo bandamento-C na população de Ubatuba, também apresentou a mesma região com marcação positiva para Ag^+RON (seta na **fig. 1C**).

O heteromorfismo diagnosticado para o par 5 apresenta variação intra-individual nas três populações, inclusive quanto aos padrões de banda-C e RON mencionados para a população de Ubatuba.

Na coloração simultânea por fluorocromos CMA_3/DAPI os braços curtos dos homólogos do par 6 invariavelmente registraram alto conteúdo de bases GC, evidenciado pelas marcações positivas para CMA_3 (setas nas **fig. 1D, 2D, 3D**), e pouco ou nenhum conteúdo em bases AT, evidenciado pelas marcações negativas para DAPI (setas nas **fig. 1E, 2E, 3E**).

DISCUSSÃO

A ocorrência de heteromorfismos cromossômicos tem sido amplamente documentada e discutida em Orthoptera, porém, poucos trabalhos abordam temas acerca da superfamília Grylloidea. Em muitos casos, as especulações não vão além do que pode permitir a análise citogenética clássica, como pode ser constatado nos estudos em Nemobiinae. Um dos poucos trabalhos em que se discute mais detalhadamente a respeito da ocorrência de heteromorfismos nesta subfamília, por exemplo, é o de Manna & Bhattacharjee (1968) a partir da análise dos cariótipos e de medidas cromossômicas em onze espécies da Índia. Neste caso, os autores verificaram a existência de inversões pericêntricas e diferenças métricas entre espécies com o mesmo número diplóide. Os autores propõem que os rearranjos, tais como as inversões pericêntricas, tiveram um papel mais acentuado no processo de evolução cariotípica do grupo ao invés, apenas, dos mecanismos de fusão e fissão previamente sugeridos por Ohmachi (1935).

No caso de *Z. atlantica*, não foram encontradas diferenças significativas com relação a número ou morfologia cromossômicos entre as três populações analisadas. Contudo, um caso de heteromorfismo referente ao par 5 merece especial atenção.

Uma primeira interpretação a partir de dados de coloração convencional sugere a existência de um rearranjo estrutural - como uma inversão pericêntrica - envolvendo um dos homólogos do par 5. Em muitas células analisadas, o braço curto de um dos homólogos mostra-se claramente descondensado e em alguns casos apresentando, inclusive, uma constrição secundária. Levando-se em conta que nos três casos estudados observaram-se variações intra-individuais e que não ocorrem as duas condições de homozigose e outra de heterozigose teoricamente esperadas, seria pouco provável a ocorrência de um rearranjo estrutural de tal tipo.

Quando são comparados os padrões de banda-C, verifica-se que a heterocromatina constitutiva apresenta distribuição pericentromérica nas três populações. O par 6 apresenta os braços curtos C-positivos e estes correspondem também às regiões organizadoras de nucléolo primárias, evidenciadas através da impregnação por prata. As RON's primárias equivalem a uma porção rica em bases GC (CMA₃-positiva), sendo este padrão já documentado em vários grupos de insetos (LORITE et al., 1997; ROCHA et al., 2002; MENEZES, 1997; BRITO-RIBON et al., 1998), inclusive em gafanhotos (CAMACHO et al., 1991; LORETO & SOUZA, 2000).

Além do padrão mencionado para as RON's primárias, na população de Ubatuba ocorre variação quanto a um grande bloco Ag⁺RON e C-positivo no homólogo heteromórfico do par 5. Este mesmo segmento, contudo, não aparece marcado por CMA₃ ou DAPI, tratando-se, portanto, de uma região com composição distinta das RON's primárias.

Alguns trabalhos, principalmente em vertebrados, têm procurado relacionar a existência de RON's heteromórficas com a presença de heterocromatina constitutiva nas mesmas (BRIDLE et al., 2002; CABRERO & CAMACHO, 1986; DOBIGNY et al., 2002; RODRÍGUEZ IÑIGO et al., 1993; PENDÁS et al., 1993; SÁNCHEZ et al., 1995; ZURITA et al., 1997; 1998; 1999). Uma das hipóteses sugeridas é a de que tais regiões correspondam simplesmente a porções cromossômicas compostas por proteínas ricas em resíduos ácidos

com afinidade pela prata e que não possuam quaisquer indícios de atividade transcricional (DOBIGNY et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 1995). Outra suposição seria de que estes segmentos contenham genes envolvidos na transcrição de DNAr e que sua marcação pela prata acontece mediante descondensação na intérfase precedente, concomitantemente com a atividade transcricional de genes ribossômicos (JIMÉNEZ et al., 1988).

No caso de *Z. atlantica*, esta porção do genoma em particular, deve representar uma RON secundária que se expressa ocasionalmente nesta população (FERNÁNDEZ-PIQUERAS et al., 1983). Mesmo parecendo representar uma região altamente repetitiva em genes ribossomais (FLAVELL & MARTINI, 1982), fica claro que a composição dessa RON secundária difere qualitativamente daquela encontrada nas RON's primárias em vários grupos animais, inclusive em Orthoptera, que são ricas em bases GC.

A existência de heterocromatina constitutiva nesta mesma porção cromossômica de um dos homólogos do par 5 poderia representar uma heterocromatina extra aí inserida, como já sugerido para acrídeos (CABRERO & CAMACHO, 1986). A presença de tal heterocromatina poderia desativar variavelmente uma seqüência muito particular de genes reguladores de transcrição das RON's. Por outro lado, assim como ocorre usualmente nas RON's primárias e em regiões pericêntricas, a presença de heterocromatina constitutiva neste segmento também deve exercer um mecanismo de proteção da integridade de determinados *loci*, impossibilitando a formação de quiasmas nos mesmos (JOHN & KING, 1980; 1983; JOHN et al., 1985).

A variação intra-individual dessa RON secundária mostra que, possivelmente existam implicações fisiológicas para os indivíduos nesta população, de modo a refletir diferenças de atividade transcricional em função das necessidades de RNAr pela célula (ZURITA et al., 1999). Aliado a isto, padrões genéticos e ambientais devem desempenhar papéis importantes na atividade reguladora de expressão das mesmas, como já salientavam Salcedo et al. (1988) e López-León et al. (1995).

Apesar de similaridades referentes a número e morfologia cromossômicos não significarem padrões exatos enquanto caracteres citotaxonômicos, os resultados aqui apresentados, comparados com os de Portugal (2002), levam-nos a crer que as três populações constituam demes de uma mesma espécie, *Zucchiella atlantica*. De qualquer

modo, a aplicação de técnicas moleculares de citogenética, integradas às aqui apresentadas, bem como sua análise comparativa com espécies relacionadas, parece constituir um passo importante na compreensão da constituição, função e das implicações dessas regiões cromossômicas dentro do genoma, assim como sua relação com os fatores ambientais.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos às Dras. Doralice M. Cella e Sanae Kasahara pelas sugestões e a Akio R. Miyoshi pela ajuda inestimável durante as coletas.

LITERATURA CITADA

BRIDLE, J. R.; DE LA TORRE, J.; BELLA, J. L.; BUTLIN, R. K.; GOSÁLVEZ, J. Low levels of chromosomal differentiation between the grasshoppers *Chorthippus brunneus* e *Chorthippus jacobsi* (Orthoptera; Acrididae) in northern Spain. **Genetica**, Dordrecht, n. 114, p. 121-127, 2002.

BRITO-RIBON, R. M.; MIYAZAWA, C. S.; POMPOLO, S. G. First karyotype characterization of four species of *Partamona* Friese, 1980 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios**, Cambridge, v. 100, p. 19-26, 1998.

CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Cytogenetic studies in gomphocerine grasshoppers. I. Comparative analysis of chromosome C-banding pattern. **Heredity**, London, v. 56, p. 365-372, 1986.

CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J.; VISERAS, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALCHE, J. P. G banding in two species of grasshoppers and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 638-643, 1991.

DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; VOLOBOUEV, V. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenet. Genome Res.**, Basel, v. 98, p. 75-77, 2002.

FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J.; RODRÍGUEZ CAMPOS, A.; SENTÍS CASTAÑO, C.; ROJO GARCÍA, E. Chromosomal location of the active NORs in the *Stenopleurus martorelli* complex. **Genetica**, Dordrecht, v. 61, p. 9-12, 1983

FLAVELL, R. B.; MARTINI, G. The genetic control of nucleolus formation with special reference to common bread wheat. In: JORDAN, E. G.; CULLIS, C.A. **The nucleolus**. Cambridge University Press, London, 1982.

GWYNNE, D. T.; DESUTTER, L.; FLOOK, P.; ROWELL, H. **Orthoptera**. In: Tree of life – Web project, 2001. Disponível em: <<http://tolweb.org/tree/eukaryotes/animal/arthropoda/hexapoda/orthoptera/orthoptera.htm>>. Acesso em: 14 out. 2003.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; LOWE WRIGHT, L.; BRAY-WARD, P.; WARD, D. C.; VANCE, G. H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, New York, v. 43, p. 101-109, 2001.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. **Heredity**, London, v. 60, p. 125-127, 1988.

JOHN, B.; KING, M. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. III. Syntetic hybrids. **Chromosoma**, Berlin, v. 78, n. 2, p.165-186, 1980.

JOHN, B.; KING, M. Population cytogenetics of *Atractomorpha similes*. I. C-band variation. **Chromosoma**, Berlin, 88, p. 57-68, 1983.

JOHN, B.; KING, M.; SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. **Chromosoma**, Berlin, v. 91, p. 185-200, 1985.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 68-74, 1995.

LORETO, V.; SOUZA, M.J. Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) in *Belosacris coccineipes* (Acrididae-Leptysminae). **Gen. Mol. Biol.**, Riberião Preto, v. 23, n. 3, p. 575-579, 2000.

LORITE, P.; ARÁNEGA, A. E.; LUQUE, F.; PALOMEQUE, T. Análisis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Heredity**, London, v. 78, p. 578-582, 1997.

MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. Studies of gryllid chromosomes. IV. Morphology, metrical study and behaviour of chromosomes during meiosis in eleven species of Nemobiinae, **J. Cytol. Genet.**, v. 3, p. 5-22, 1968.

MELLO, F. A. G. A new genus and species of nemobiine cricket from the brazilian atlantic forest (Orthoptera, Gryllidae, Nemobiinae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 569-571, 1990.

MENEZES, M. B. F. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1997. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1997.

OHMACHI, F. A comparative study of chromosome complements in the Gryllodea in relation to taxonomy. **Bull. Mie Imp. Coll. Agr. For.**, v. 5, p. 1-48, 1935.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogen. Cell Genet.**, Basel, v. 63, p. 128-130, 1993.

PORTUGAL, C. B. **Estudo taxonômico, morfológico e citogenético de duas populações de grilos do gênero *Zucchiella* Mello, 1990 (Orthoptera, Trigonidiidae)**. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso - Inst. Biociências, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro. 2002.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; DERGAM, J. A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 19-27, 2002.

RODRÍGUEZ IÑIGO, E.; BELLA, J. L.; GARCÍA DE LA VEGA, C. Heterochromatin differentiation between two species of the genus *Dociostaurus* (Orthoptera: Acrididae). **Heredity**, London, v. 70, p. 458-465, 1992.

SALCEDO, F. J.; VISERAS, E.; CAMACHO, J. P. M. The B chromosomes of *Locusta migratória*. III. Effects on the activity of nucleolar organizer regions. **Genome**, 30:387-394, 1988.

SÁNCHEZ, A.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; STITOU, S.; ZURITA, F.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity**, London, v. 75, p. 10-16, 1995.

SANTOS, J. L.; ARANA, P.; GIRALDEZ, R. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea. **Genetica**, Dordrecht, v. 61, p. 656-74, 1983.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v. 27, p. 190-193, 1980.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 75, p. 304-306, 1972.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**, London, v. 78, p. 229-234, 1997.

ZURITA, F.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; DE LA GUARDIA, R. D. Sequential silver staining and *in situ* hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. **J. Cell Sci.**, London, v. 111, p. 1433-1439, 1998.

ZURITA, F.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D.; BURGOS, M. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and *in-situ* hybridization study. **Chromosom. Res.**, Oxford, v. 7, p. 563-570, 1999.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1973. 961 p.

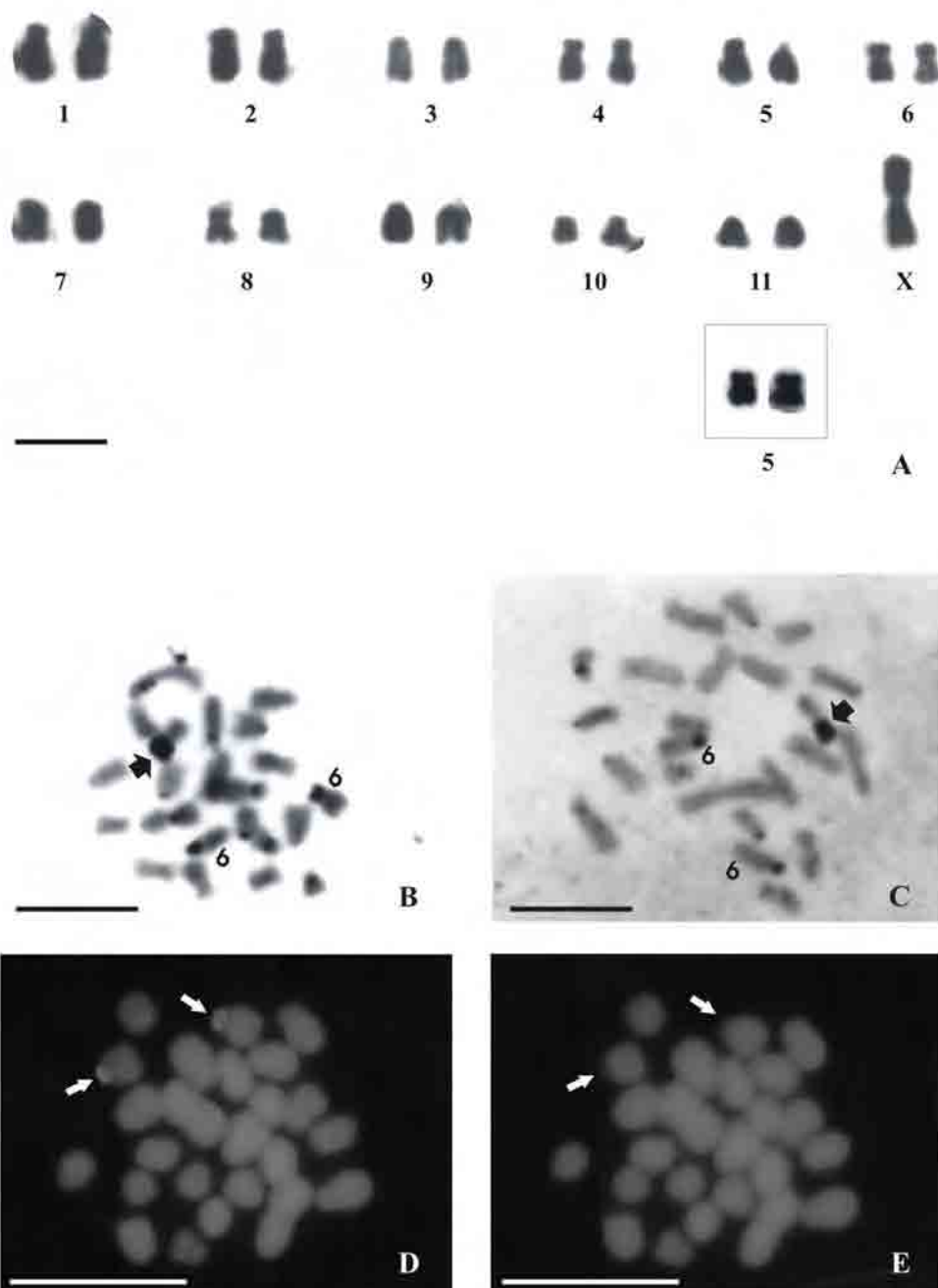


Figura 1: Cromossomos mitóticos de *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, população de Ubatuba. $2n=23, XO$ (machos) e $2n=24, XX$ (fêmeas). (A) Cariótipo (coloração convencional). Quadro indicando par 5. (B) Bandamento-C. Seta indicando homólogo do par 5 com bloco C-positivo. (C) Ag⁺RON. Seta indicando homólogo do par 5 com marcação positiva. (D) Fluorocromo CMA. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação positiva. (E) Fluorocromo DAPI. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação negativa. Barras: 10µm.

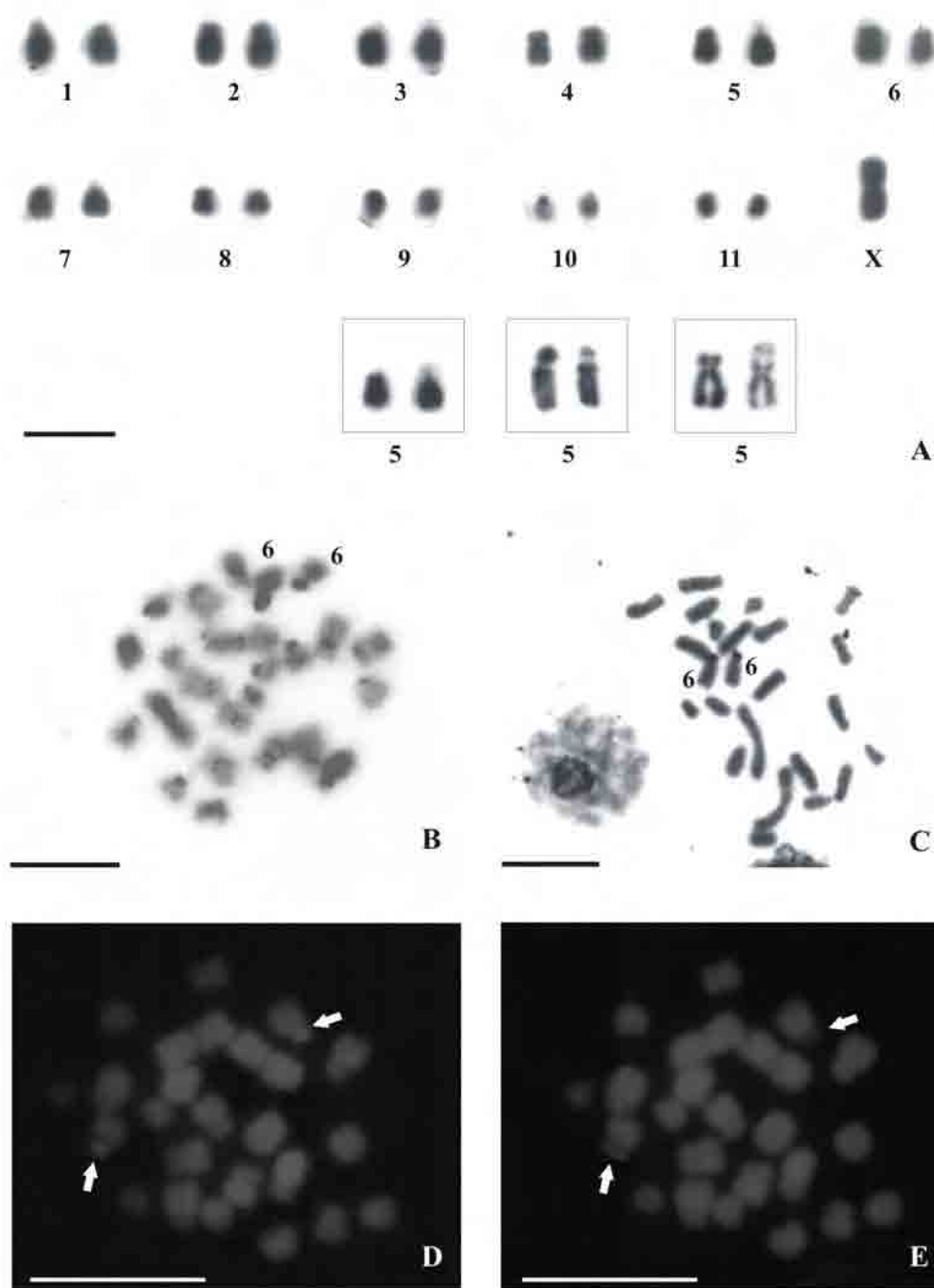


Figura 2: Cromossomos mitóticos de *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, população de São Luiz do Paraitinga, $2n=23, XO$ (machos) e $2n=24, XX$ (fêmeas). (A) Cariótipo (coloração convencional). Quadro indicando par 5. (B) Bandamento-C. (C) Ag⁺RON. (D) Fluorocromo CMA. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação positiva. (E) Fluorocromo DAPI. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação negativa. Barras: 10μm.

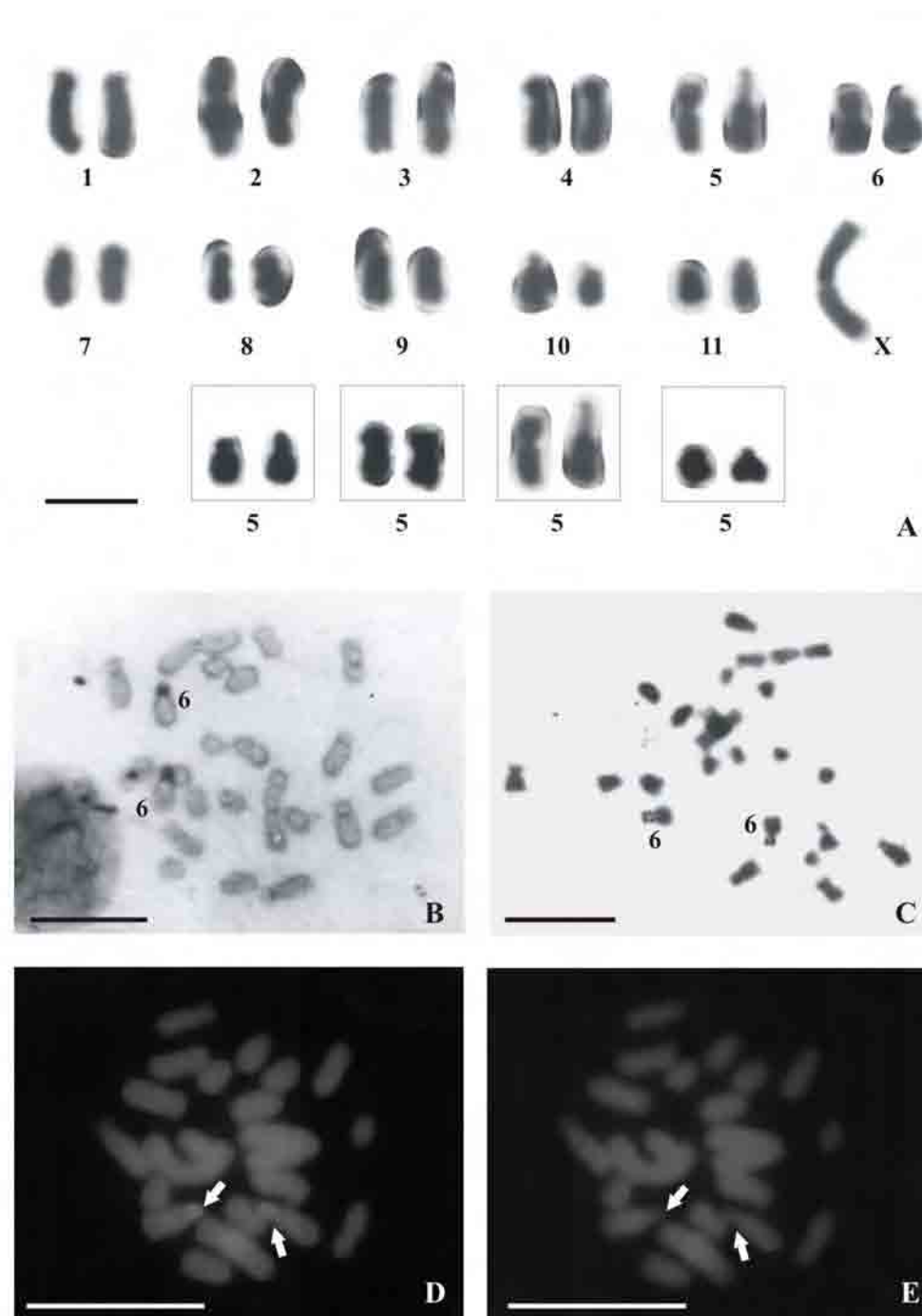


Figura 3: Cromossomos mitóticos de *Zucchiella atlantica* Mello, 1990, população de Corumbataí, $2n=23, XO$ (machos) e $2n=24, XX$ (fêmeas). (A) Cariótipo (coloração convencional). Quadro indicando par 5. (B) Bandamento-C. (C) Ag⁺RON. (D) Fluorocromo CMA. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação positiva. (E) Fluorocromo DAPI. Setas indicando braços curtos do par 6 com marcação negativa. Barras: 10 μ m.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos preliminares em *Zucchiella atlantica*, baseados especialmente em caracteres morfológicos e em alguns apontamentos iniciais sobre citogenética, delineavam a possibilidade de que as três populações conhecidas pudessem compreender espécies crípticas de um mesmo gênero (PORTUGAL, 2002).

O objetivo do trabalho aqui apresentado foi o de oferecer subsídios à taxonomia clássica e integrar o entendimento sobre o caso por meio da caracterização cromossômica sob coloração convencional e diferencial. Assim, esta proposta justificava-se pelo fato de as três populações ocuparem nichos diversos no que se refere às características climáticas e sazonais. Além disso, vale ressaltar que, por tratarem-se de insetos diminutos e ápteros, um primeiro ponto de especulação seria com base no modelo de especiação estasipátrica (WHITE, 1973), que justamente propõe uma associação no papel dos rearranjos cromossômicos com a baixa vagilidade da espécie na constituição de tal mecanismo evolutivo.

Apesar de similaridades referentes a número e morfologia cromossômicos não significarem padrões exatos enquanto caracteres citotaxonômicos, os resultados aqui apresentados, comparados com os de Portugal (2002), levam-nos a crer que as três populações constituam demes de *Zucchiella atlantica* com distribuição descontínua.

O cariótipo encontrado em *Z. atlantica*, $2n=23$, XO (machos) e $2n=24$, XX (fêmeas), em comparação com outros estudos citogenéticos sobre a subfamília Nemobiinae,

revelou ser este o número mais alto diagnosticado e sugere, assim, uma condição plesiomórfica dentro do grupo.

Reiterando as primeiras suposições de Ohmachi (1927b), de que a tendência na evolução cariotípica em Nemobiinae seria orientada especificamente por mecanismos de fusão e fissão, Manna & Bhattacharjee (1968) já defendiam a hipótese de que rearranjos cromossômicos, tais como as inversões pericêntricas, desempenharam talvez um papel mais acentuado neste contexto. De fato, a tendência evolutiva em espécies de Orthoptera é a de redução do número cariotípico e especial atenção deve ser dada tanto aos mecanismos de fusão quanto aos de inversão.

Da mesma forma, a ocorrência de polimorfismos na subfamília Nemobiinae parece relativamente freqüente, apesar de os trabalhos serem relativamente escassos e não irem além do que pode sugerir a citogenética clássica. Como um caso mais explícito, pode-se citar o de Manna & Bhattacharjee (1968), a partir da análise dos cariótipos e de medidas cromossômicas em onze espécies indianas. Neste caso, os autores verificaram a existência de inversões heterozigotas e diferenças métricas entre espécies com o mesmo número diplóide, utilizando tais critérios na citotaxonomia do grupo. Outras contribuições também foram acrescentadas, tanto em função de variação do número de cromossomos em diferentes indivíduos de uma mesma espécie (HONDA, 1926; SUZUKI, 1932; 1933; OHMACHI, 1935; OHMACHI & UESHIMA, 1957) quanto em função de variação cromossômica estrutural (OHMACHI, 1935; MANNA & BHATTACHARJEE, 1962; 1963).

No presente estudo, uma primeira interpretação dos cariótipos analisados parece sugerir também a existência de um heteromorfismo estrutural envolvendo uma inversão cêntrica. Contudo, tal ocorrência seria teoricamente improvável, uma vez que o heteromorfismo ocorre enquanto variação intra-individual e apenas uma das condições de homozigose e outra de heterozigose foram detectadas. Apesar de o número amostral poder ser considerado baixo para tais implicações, as análises dos padrões de banda-C e de Ag⁺RON revelaram um panorama distinto do que poderia se supor inicialmente.

O par 5, de fato, constitui um par heteromórfico com variação intra-individual e caracteriza as três populações de *Z. atlantica*. Na população de Ubatuba, contudo, um de

seus homólogos apresenta variação para um grande bloco Ag⁺RON e C-positivo no braço curto.

Evidências de diversos grupos já relacionaram a existência de RON's heteromórficas com a presença de heterocromatina constitutiva nas mesmas (BRIDLE et al., 2002; CABRERO & CAMACHO, 1986; DOBIGNY et al., 2002; RODRÍGUEZ IÑIGO *et al.*, 1993; PENDÁS et al., 1993; SÁNCHEZ et al., 1995; ZURITA et al., 1997; ZURITA et al., 1998; ZURITA et al., 1999). Uma das hipóteses aventadas é a de que tais regiões correspondam a porções cromossômicas compostas por proteínas ricas em resíduos ácidos com afinidade pela prata e que não possuam quaisquer indícios de atividade transcricional (DOBIGNY et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 1995). Outra suposição seria de que estes segmentos contenham genes envolvidos na transcrição de DNAr e que sua marcação pela prata acontece mediante descondensação na intérfase precedente, juntamente com a atividade transcricional de genes ribossômicos (JIMÉNEZ et al., 1988).

O caso diagnosticado para a população de Ubatuba não parece envolver simplesmente uma região rica em proteínas com resíduos ácidos, mas sim constituir uma região cromossômica envolvida em atividade transcricional e que se comporta como uma RON secundária dentro do complemento (FERNÁNDEZ-PIQUERAS et al., 1983). Esta RON tem composição distinta das RON's primárias, uma vez que não foram marcadas pelo fluorocromo CMA₃ e deve expressar-se ocasionalmente nas células.

Os dados aqui obtidos com a utilização de fluorocromos AT e CG específicos reafirmam as observações feitas em outros grupos de insetos (LORITE et al., 1997; ROCHA et al., 2002; MENEZES, 1997; BRITO-RIBON et al., 1998), inclusive em ortópteros (CAMACHO et al., 1991; LORETO & SOUZA, 2000), de que as RON's primárias são formadas por seqüências ricas em bases CG. Assim sendo, o fluorocromo CMA₃ poderia ser utilizado como marcador das RON's, independentemente da ativação transcricional das mesmas. O fluorocromo DAPI, em contrapartida, parece não ser um bom recurso para possíveis diagnósticos de regiões cromossômicas específicas.

Por outro lado, a existência de heterocromatina constitutiva neste segmento de um dos homólogos do par 5 poderia representar uma heterocromatina extra aí inserida, como já sugerido para acrídeos (CABRERO & CAMACHO, 1986). A presença de tal

heterocromatina poderia desativar variavelmente uma sequência muito particular de genes reguladores de transcrição das RON's. Por outro lado, assim como ocorre usualmente nas RON's primárias e em regiões pericêntricas, a presença de heterocromatina constitutiva neste segmento também deve exercer um mecanismo de proteção da integridade de determinados *loci*, impossibilitando a formação de quiasmas nos mesmos (JOHN et al., 1985; JOHN & KING, 1980; 1983).

Apesar de estudos comparativos mais aprofundados mostrarem-se necessários, acreditamos que esse polimorfismo cromossômico tenha implicações fisiológicas para os indivíduos nesta população e que padrões ambientais também devem desempenhar papéis importantes na atividade reguladora de expressão dessa RON secundária (SALCEDO et al., 1988; LÓPEZ-LEÓN et al., 1995).

Estes resultados trazem dados importantes para que se aprofundem as informações a respeito da evolução cariotípica no grupo e dos mecanismos de regulação de RON's primárias e secundárias. Do mesmo modo a ocorrência de heteromorfismos cromossômicos deve ser melhor compreendida já que sua ocorrência é relativamente freqüente em Nemobiinae e pode representar um importante caráter citotaxonômico.

Sem dúvidas, alguns questionamentos foram aqui abertos e seguramente outros estudos com uma maior amostragem geográfica e com propostas de comparação interespecífica que venham a integrar novas ferramentas citogenéticas às aqui aplicadas devem fornecer novas perspectivas sobre o entendimento que se tem a respeito da biologia dos nemobíneos.

VI. LITERATURA CITADA

BAUMGARTNER, W. J. Die Spermatogenese bei einer Grille *Nemobius fasciatus*. **Zellforsch Mikroskop. Anat.**, v. 9, p. 603-639, 1929.

BRIDLE, J. R.; DE LA TORRE, J.; BELLA, J. L.; BUTLIN, R. K.; GOSÁLVEZ, J. Low levels of chromosomal differentiation between the grasshoppers *Chorthippus brunneus* e *Chorthippus jacobsi* (Orthoptera; Acrididae) in northern Spain. **Genetica**, Dordrecht, n. 114, p. 121-127, 2002.

BRITO-RIBON, R. M.; MIYAZAWA, C. S.; POMPOLO, S. G. First karyotype characterization of four species of *Partamona* Friese, 1980 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios**, Cambridge, v. 100, p. 19-26, 1998.

BUGROV, A.; WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E. Chromosome numbers and C-banding patterns in some Pamphagidae grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) from the Caucasus, Central Asia and Transbaikalia. **Folia Biol.**, Kraków, v. 45, p. 133-138, 1997.

BUGROV, A.; WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E. Chromosome C-banding patterns in isolated population of the grasshopper *Podisma pedestris* (L.) (Orthoptera, Acrididae) from the Altai Mts. **Folia Biol.**, Kraków, v.50, p. 23-28, 2002

BUGROV, A.; WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A. Karyotype evolution and chromosome C-banding pattern in some Podismini grasshoppers (Orthoptera, Acrididae). **Caryologia**, Firenze, v. 47, p. 183-191, 1994.

BUGROV, A.; WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; ITO, G.; TCHERNYKH, A.; MARYATI, M. Karyotype and C-banding patterns of the katydids *Meconema elongata* (L.) (Orthoptera, Tettigoniidae, Mecopodinae) from Amami Is. (Japan) and Borneo (Malaysia). **Caryologia**, Firenze, v. 57, p. 25-29, 2004.

CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Cytogenetic studies in gomphocerine grasshoppers. I. Comparative analysis of chromosome C-banding pattern. **Heredity**, London, v. 56, p. 365-372, 1986.

CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J.; VISERAS, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALCHE, J. P. G banding in two species of grasshoppers and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 638-643, 1991.

CAMACHO, J. P. M.; VISERAS, E.; NAVAS, J.; CABRERO, J. C-heterochromatin content of supernumerary chromosome segments of grasshoppers: detection of an euchromatic extra segment. **Heredity**, London, v. 53, p. 167-175, 1984.

DAVENPORT, R. **The cytotaxonomy of the genus *Nemobius* (Orthoptera: Gryllidae: Nemobiinae)**. Ph.D. dissertation, The John Hopkins Univ., Baltimore, Maryland, 1960.

DAVENPORT, R. Chromosomal polymorphism and speciation in the genus *Eunemobius* (Orthoptera: Grylloidea). **Genetica**, Dordrecht, v. 68, p. 105-107, 1986.

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S.; ZEFA, E. **Comparação citogenética de três espécies crípticas de *Gryllus* (Orthoptera: Gryllidae)**. In: Congr. Bras. de Zool., 21.; 2002, Itajaí. p. 171.

DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; VOLOBOUEV, V. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenet. Genome Res.**, Basel, v. 98, p. 75-77, 2002.

DRETS, M. E.; STOLL, M. C-banding and non-homologous association in *Gryllus argentinus*. **Chromosoma**, Berlin, v. 48, p. 367-390, 1974.

FAVRELLE, M. Contribution a l'étude de la garniture chromosomique des orthoptères (Gryllidae et Tettigoniidae). **Ann. Mus. R. Hist. Nat. de Belg.**, Bruxelles, v. 10, n. 3, p. 53-60, 1936.

FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J.; RODRÍGUEZ CAMPOS, A.; SENTÍS CASTAÑO, C.; ROJO GARCÍA, E. Chromosomal location of the active NORs in the *Stenopleurus martorelli* complex. **Genetica**, Dordrecht v. 61, p. 9-12, 1983.

FLAVELL, R. B.; MARTINI, G. The genetic control of nucleolus formation with special reference to common bread wheat. In: JORDAN, E. G.; CULLIS, C.A. **The nucleolus**. Cambridge University Press, London, 1982.

FONTANETTI, C.S.; ZEFA, E.; MARIN-MORALES, M. A.; MESA, A. Characterization of the chromosomes of *Gryllus assimilis* by band C, RON, DA/CMA/DAPI (Orthoptera, Gryllidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, Suppl. S, v. 81, n. 2, p. 86, 1998.

GARCÍA, P. C. Caracterização da morfologia, das emissões sonoras e da citogenética de quatro espécies de *Anurogryllus* (Orthoptera, Gryllidae) do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

GWYNNE, D. T.; DESUTTER, L.; FLOOK, P.; ROWELL, H. **Orthoptera**. In: Tree of life – Web project, 2001. Disponível em: <<http://tolweb.org/tree/eukaryotes/animal/arthropoda/hexapoda/orthoptera/orthoptera.htm>>. Acesso em: 14 out. 2003.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; LOWE WRIGHT, L.; BRAY-WARD, P.; WARD, D. C.; VANCE, G. H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, New York, v. 43, p. 101-109, 2001.

HEWITT, G. M. **Grasshoppers and crickets**, Animal cytogenetics, v. 3: Insecta 1, Orthoptera. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 1979. 170 p.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, Basel, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HONDA, H. The chromosome numbers and the multiple chromosomes in Gryllinae. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo, v. 2, n. 10, p. 562-564, 1926.

ĨÑIGO, E. R.; BELLA, J. L.; DELAVEGA, C. G. Heterochromatin differentiation between 2 species of the genus *Dociostaurus* (Orthoptera, Acrididae). **Heredity**, London, v. 70, p. 458-465, part 5, 1993.

JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. **Heredity**, London, v. 60, p. 125-127, 1988.

JOHN, B. The cytogenetic systems of grasshoppers and locusts. II. The origin and evolution of supernumerary segments. **Chromosoma**, Berlin, v. 44, p. 123-146, 1973.

JOHN, B. Heterochromatin variation in natural populations. **Chromosomes Today**, v. 7, p. 128-137, 1981.

JOHN, B.; KING, M. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. II. Patterns of C-banding. **Chromosoma**, Berlin, v. 65, p. 59-79, 1977.

JOHN, B.; KING, M. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. III. Syntetic hybrids. **Chromosoma**, Berlin, v. 78, n. 2, p. 165-186, 1980.

JOHN, B.; KING, M. Meiotic effects of supernumerary heterochromatin in *Heteropternis obscurella*. **Chromosoma**, Berlin, v. 85, p. 39-65, 1982.

- JOHN, B.; KING, M. Population cytogenetics of *Atractomorpha similes*. I. C-band variation. **Chromosoma**, Berlin, 88, p. 57-68, 1983.
- JOHN, B.; KING, M.; SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. **Chromosoma**, Berlin, v. 91, p. 185-200, 1985.
- JOHNSTONE, D. E.; VICKERY, V. R. Notes on the *Palustris-Cubensis* complex of the genus *Neonemobius* Hebard (Orthoptera: Gryllidae: Nemobiinae). **J. Ga. Entomol. Soc.**, Athens, v. 5, n. 4, p. 233-241, 1970.
- LIM, H. C. Note on the chromosomes of the Nemobiinae (Gryllidae). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 49, p. 391-395, 1971.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 68-74, 1995.
- LORETO, V.; SOUZA, M.J. Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) in *Belosacris coccineipes* (Acrididae-Leptysminae). **Gen. Mol. Biol.**, Riberião Preto, v. 23, n. 3, p. 575-579, 2000.
- LORITE, P.; ARÁNEGA, A. E.; LUQUE, F.; PALOMEQUE, T. Análisis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Heredity**, London, v. 78, p. 578-582, 1997.
- MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. On the chromosomal polymorphism in a gryllid, *Gryllulus confirmatus*. In: ALL INDIA CONGR. ZOOL., 2nd, Varanasi, 1962, p. 9.
- MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. Chromosomal polymorphism in a Gryllid, *Pteronemobius taprobanensis*. In: IND. SCI. CONGR., 50th, 1963. **Proc. 50th Ind. Sci. Congr.**, pt. 3, p. 472-473.
- MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. Studies of gryllid chromosomes. II. Chromosomal polymorphisms in *Pteronemobius taprobanensis* (Walk.) and chromosome morphology of *Loxoblemmus* sp. **Cytologia**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 196-206, 1964.
- MANNA, G. K.; BHATTACHARJEE, T. K. Studies of gryllid chromosomes. IV. Morphology, metrical study and behaviour of chromosomes during meiosis in eleven species of Nemobiinae, **J. Cytol. Genet.**, v. 3, p. 5-22, 1968.
- MELLO, F. A. G. A new genus and species of nemobiine cricket from the brazilian atlantic forest (Orthoptera, Gryllidae, Nemobiinae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 569-571, 1990.

- MENEZES, M. B. F. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1997. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1997.
- MESA, A.; RIBAS, C.C. Karyology of a new species of the genus *Phoremia* (Grylloidea, Nemobiinae). **Braz. J. Genet.**, Ribeirão Preto, Suppl., v. 9, n. 3, p. 120, 1996.
- MESA, A.; RIBAS, C. C.; GARCÍA, P. *Phoremia nigrofasciata* and *P. circumcincta*: two new species of cricket of the subfamily Nemobiinae (Orthoptera, Grylloidea, Trigonidiidae). **J. Orthoptera Res.**, Philadelphia, v. 8, p. 59-64, 1999.
- MIKLOS, G. L. G.; NANKIVELL, R. N. Telomeric satellite DNA functions in regulating recombination. **Chromosoma**, Berlin, v. 56, p. 143-167, 1976.
- NANKIVEL, R. N. Karyotype differences in the *crenaticeps*-group of *Atractomorpha* (Orthoptera, Acridoidea, Pyrgomorphidae). **Chromosoma**, Berlin, v. 56, p. 127-142, 1976.
- OHMACHI, F. Preliminary note on cytological studies on Grylloidea: chromosome numbers and sex chromosome of eighteen species. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo, v. 3, p. 451-456, 1927a.
- OHMACHI, F. Preliminary note on a new system in the classification of Grylloidea. **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokyo, v. 3, n. 7, p. 457-460, 1927b.
- OHMACHI, F. On the chromosome numbers and sex chromosomes of four species of Grylloidea (preliminary note). **Proc. Imp. Acad. Japan**, Tokio, v. 5, n. 3, p. 354-356, 1929.
- OHMACHI, F. A comparative study of chromosome complements in the Grylloidea in relation to taxonomy. **Bull. Mie Imp. Coll. Agr. For.**, v. 5, p. 1-48, 1935.
- OHMACHI, F. A list of the chromosome numbers in the Grylloidea. **Tsue**, Japan, p. 1-6, 1951.
- OHMACHI, F.; UESHIMA, N. Variations of chromosome complement in *Euscirtus hemelytrus* De Hann. (Orthoptera: Grylloidea). **Bull. Fac. Agr. Mie. Univ.**, v. 10, p. 21-31, 1957.
- OTTE, D. **Orthoptera species file: Crickets (Grylloidea)**. The Orthopt. Soc., Ac. Nat. Sci. Philadelphia. 1994.
- OTTE, D.; EADES, D.C.; NASKRECKI, P. 2001. **Orthoptera Species File** on Line, v.2.2. Disponível em < <http://osf2x.orthoptera.org/OSF2.2/OSF2X2Frameset.htm> >. Acesso em 10 mar. 2005.

PASSETTI, F. **A caracterização cromossômica, a bioacústica e a morfologia da *pars stridens* de uma população de *Gryllus* (Orthoptera: Gryllidae) do cerrado de Itirapina, SP.** 1999. Trabalho de Conclusão de Curso - Inst. Biociências, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro. 1999.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cell Genet.**, Basel, v. 63, p. 128-130, 1993.

PEREIRA, L. G.; SOUZA, M. J. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae: Orthoptera). **Cytobios**, Cambridge, v. 103, n. 403, p. 111-119, 2000.

PORTUGAL, C. B. **Estudo taxonômico, morfológico e citogenético de duas populações de grilos do gênero *Zucchiella* Mello, 1990 (Orthoptera, Trigonidiidae).** 2002. Trabalho de Conclusão de Curso - Inst. Biociências, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro. 2002.

ROCHA, M. F.; SOUZA, M. J.; MOURA, R. D. Karyotypic analysis, constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). **Caryologia**, Firenze, v. 57 n. 01, p. 107-116, 2004.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; DERGAM, J. A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 19-27, 2002.

RODRÍGUEZ IÑIGO, E.; BELLA, J. L.; GARCÍA DE LA VEGA, C. Heterochromatin differentiation between two species of the genus *Dociostaurus* (Orthoptera: Acrididae). **Heredity**, London, v. 70, p. 458-465, 1993.

SALCEDO, F. J.; VISERAS, E.; CAMACHO, J. P. M. The B chromosomes of *Locusta migratoria*. III. Effects on the activity of nucleolar organizer regions. **Genome**, Ottawa, v. 30, p. 387-394, 1988.

SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Quantitative analysis of silver staining on the nucleolar organizing region in *Eliomys quercinus*. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 978-982, 1989.

SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Variable conservation of nucleolus organizer regions during karyotypic evolution in Microtidae. **Genome**, Ottawa, v. 33, p. 119-122, 1990.

SÁNCHEZ, A.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; STITOU, S.; ZURITA, F.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity**, London, v. 75, p. 10-16, 1995.

- SANTOS, J. L.; ARANA, P.; GIRALDEZ, R. Chromosome C-banding patterns in Spanish Acridoidea. **Genetica**, Dordrecht, v. 61, p. 656-74, 1983.
- SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, Berlin, v. 87, p. 327-344, 1982.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v. 27, p. 190-193, 1980.
- SHAW, D. D.; WEBB, G. C.; WILKINSON, P. Population cytogenetics of the genus *Caledia* (Orthoptera: Acrididae). II. Variation in the pattern of C-banding. **Chromosoma**, Berlin, v. 56, p. 169-190, 1976.
- SOUZA, M. J.; HAVER, P. R. D.; MELO, N. F. Karyotype, C- and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper *Xestotrichus robustus* (Romaleidae). **Caryologia**, Firenze, v. 56, n. 3, p. 261-267, 2003.
- SOUZA, M. J.; MOURA, R. D. Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera, Proscopidae). **Cytobios**, Cambridge, v. 101, n. 398, p. 137-144, 2000.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUZUKI, K. Preliminary note on the chromosome alteration by X-rays in *Loxoblemmus arietalis*, a species of grylloid family. **Proc. Imp. Acad. Japan**, v. 8, p. 521-523, 1932.
- SUZUKI, K. The variation of chromosome number in *Loxoblemmus arietalis*, a species of grylloid family. **Proc. Imp. Acad. Japan**, v. 9, p. 330-332, 1933.
- SUZUKI, H.; KURIHARA, Y.; KANEHISA, T.; MORIWAKI, K. Variation in the distribution of silver-stained nucleolar organizing regions on the chromosomes of the wild mouse *Mus musculus*. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 7, p. 271-282, 1990.
- TATEISHI, S. Preliminary report on the chromosomes of several species of Gryllodea from Formosa. **Zool. Mag.**, Tokyo, v. 44, p. 10-13, 1932.
- VERMA, R. S.; BABU, A. **Human Chromosomes: principles and techniques**. McGraw-Hill, 2nd ed., 1995. 419 p.
- VERMA, R. S.; DOSIK, H. Human chromosomal heteromorphisms: nature and clinical significance. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 62, p. 361-383, 1980.

VICKERY, V. R. Two species of *Pteronemobius* previously unreported in Quebec (Orthoptera: Ensifera: Grylloidea: Nemobiinae). **Ann. Soc. Entomol. Que.**, Quebec, v.14, n. 1, p. 22-24, 1969.

VICKERY, V. R. Notes on *Pteronemobius* and a new genus of the tribe Pteronemobiini (Orthoptera: Gryllidae: Nemobiinae). **Can. Entomol.**, Ottawa, v. 105, p. 419-424, 1973.

VICKERY, V. R.; JOHNSTONE, D. E. Generic status of some Nemobiinae (Orthoptera: Gryllidae) in North America. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, College Park, v. 63, n. 6, p. 1740-1749, 1970.

VICKERY, V. R.; JOHNSTONE, D. E. The Nemobiinae (Orthoptera: Gryllidae) of Canada. **Can. Entomol.**, Ottawa, v. 105, p. 623-645, 1973.

VICKERY, V. R.; WEISSMAN, D. B. *Neonemobius eurynotus* (Rehn and Hebard) (Grylloptera: Trigonidiidae: Nemobiinae), a cricket of the San Francisco Bay area, California. **Pan-Pac. Entomol.**, San Francisco, v. 65, n. 01, p. 68-73, 1989.

ZEFA, E. Autosomal rearrangement in *Gryllus assimilis* Fabricius, 1775 (Orthoptera, Gryllidae). **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 333-336, 1999.

ZEFA, E. **Comportamento, bioacústica, morfologia e citogenética de algumas espécies do gênero *Endecous* Saussure, 1978 (Orthoptera, Gryllidae) do Estado de São Paulo.** 2000. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

ZEFA, E.; MESA, A. O cariótipo de duas populações de grilos *Endecous* Saussure, 1978 (Orthoptera, Phalangopsidae) do cerrado e da caverna. **Braz. J. Genet.**, Ribeirão Preto, Suppl., v. 20, n. 3, p. 65, 1997.

ZURITA, F.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**, London, v. 78, p. 229-234, 1997.

ZURITA, F.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; DE LA GUARDIA, R. D. Sequential silver staining and *in situ* hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. **J. Cell Sci.**, London, v. 111, p. 1433-1439, 1998.

ZURITA, F.; JIMÉNEZ, R.; DE LA GUARDIA, R. D.; BURGOS, M. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and *in-situ* hybridization study. **Chromosom. Res.**, Oxford, v. 7, p. 563-570, 1999.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; BUGROV, A. G. Karyotypes and C-banding patterns of Bradyporinae (Orthoptera, Tettigoniidae). **Folia Biol.**, Kraków, v. 44, p. 95-98, 1996.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; BUGROV, A. G. C-heterochromatin variation in *Deracantha onos* (Pall.) (Deracanthini, Bradyporinae, Tettigoniidae, Orthoptera). **Cytologia**, Tokyo, v. 62, p. 7-12, 1997.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; BUGROV, A. G. Karyotypes and C-banding patterns of some Phaneropterinae katydids (Orthoptera, Tettigoniidae) with special attention to a post-reductional division of the neo-X and neo-Y sex chromosomes in *Isophya hemiptera*. **Folia Biol.**, Kraków, v. 46, p. 47-54, 1998.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; BUGROV, A. G.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A. Karyotypes, C-banding pattern and NORs of the genus *Montana* Zeuner, 1941 (Orthoptera, Tettigoniidae, Decticinae). **Folia Biol.**, Kraków, v. 42, p. 89-94. 1994a.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; BUGROV, A. G.; TATSUTA, H.; AKIMOTO, S. B chromosomes, translocation between B and autosomes, and C-heterochromatin polymorphism of the grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae) in Hokkaido, Northern Japan. **Folia Biol.**, Kraków, v. 49, n. 1-2, p. 63-75, 2001.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; HELLER, K-G. C-Banding patterns of some species of Phaneropterinae (Orthoptera, Tettigoniidae) of Europe. **Folia Biol.**, Kraków, v. 46, p. 179-183, 1998.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; KOSTIA, D. Chromosomes of *Tachycines coreanus* Yamasaki, 1969 (Orthoptera: Raphidophoridae: Aemodogryllinae). Karyotype, C-bands and NORs. **Folia Biol.**, Kraków, v. 44, n. 1-2, p. 1-4, 1996.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A. Karyotypes, C-bands, NORs location in spermatogenesis of *Isophya brevipennis* Brunner (Orthoptera: Phaneropteridae). **Caryologia**, Firenze, v. 45, p. 83-89. 1992.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A. Cytogenetic studies of the genus *Tettigonia* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoninae). II. Heteromorphism of C-bands. **Folia Biol.**, Kraków, v. 43, p. 99-106, 1995.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A.; BUGROV, A. G. Karyotypes, C-heterochromatin and NOR in three species of the genus *Gampsocleis* Fieb. (Orthoptera: Tettigoniidae: Decticinae). **Folia Biol.**, Kraków, v. 40, p. 119-127. 1992.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A.; JORDAN, M. C- and G-banding in mitotic chromosomes of *Acheta domesticus* L. (Orthoptera). **Folia Biol.**, Kraków, v. 26, p. 295-300, 1978.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A.; KOSTIA, D. Chromosomes of *Diestrammena unicolor unicolor* Brunner von Wattenwyl, 1888 and *Paratachycines (Hemitachycines) boldyrievi* Uvarov, 1926 (Orthoptera, Raphidophoridae, Aemogryllinae). Karyotype, C-band, NORs. **Folia Biol.**, Kraków, n. 41, p. 77-82. 1993.

WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARIAŃSKA-NADACHOVSKA, A.; MASSA, B. Some new data on C-bands and NORs in three species of Pamphagidae (Orthoptera). **Folia Biol.**, Kraków, v. 42, p. 13-18. 1994b.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1973. 961 p.