

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E POPULACIONAL DO CROMOSSOMO B DE *METALEPTEA BREVICORNIS ADSPERSA* (ORTHOPTERA – ACRIDIDAE).

Gabriel Allisson de França Câmara¹; Vilma Loreto²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado - CCB – UFPE; E-mail: gabrielcamarafa@gmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Genética – CCB – UFPE. E-mail: vloreto@bol.com.br.

Sumário: A espécie de gafanhoto *Metaleptea brevicornis adspersa*, pertencente à família Acrididae, cujo cariótipo é $2n=23,X0$ em machos e $2n=24,XX$ em fêmeas, pode ser encontrada na América Central e do Sul e em populações da Argentina dessa espécie a ocorrência de cromossomo B foi descrita. Para identificar a presença de cromossomo B em populações brasileiras e caracterizá-lo citogeneticamente foram utilizadas técnicas de análise convencional, bandeamento C e impregnação com nitrato de prata. Foram analisados 79 indivíduos machos adultos da espécie coletados em oito diferentes localidades do Pará e de Pernambuco. Apenas seis indivíduos apresentaram o cromossomo B resultando em uma prevalência de 7,6%. Foi observado que o cromossomo extra da espécie tem morfologia metacêntrica e demonstra formato em anel, caracterizando sua natureza de isocromossomo. Além disso, durante a meiose mostrou-se inicialmente heteropicnótico e posteriormente isopicnótico. Pelo bandeamento C foi observado blocos pericentroméricos de heterocromatina constitutiva em todos os cromossomos da espécie, inclusive no cromossomo supernumerário. O fato do cromossomo B de *M. b. adspersa* possuir um bloco pericentromérico de heterocromatina constitutiva é uma característica incomum, embora tenha ocorrido em outras espécies. A impregnação por nitrato de prata evidenciou que a espécie possui apenas um par cromossômico com RONS, fato comum em Acrididae.

Palavras-chave: citogenética, cromossomo B, gafanhoto, populações.

INTRODUÇÃO

Metaleptea brevicornis adspersa pertence à subfamília Acridinae e família Acrididae, e possui distribuição global. Esta espécie incide em regiões da América Central e do Sul, e no Brasil é amplamente difundida em áreas de Floresta tropical e até em ilhas oceânicas como o arquipélago de Trindade (Carbonell, 1977; OSF). Do ponto de vista cromossômico *Metaleptea b. adspersa* possui cariótipo do tipo $2n=23,X0$ para machos e $2n=24,XX$ para fêmeas. Cromossomos B são considerados elementos extra e dispensáveis encontrados dentro do complemento cromossômico de cerca de 15% dos eucariotos. Cerca de 80% dos casos de polimorfismos para cromossomos B no reino animal ocorrem em insetos, principalmente dípteros, coleópteros e ortópteros. Em relação a sua natureza, os cromossomos B podem mostrar conteúdos de heterocromatina constitutiva (HC) variáveis (Henriques-Gil et al., 1984). Além disso, a presença de sequências de DNA repetitivo, como DNAr, DNA satélite e elementos de transposição parece constituir as principais frações desses elementos (Camacho *et al.*, 2000). O tipo de DNA repetitivo mais frequentemente encontrado em cromossomos B é o DNAr 45S. Este gene está localizado em sítios nos cromossomos chamados de regiões organizadoras de nucléolo (RONS). A visualização fenotípica da transcrição do RNA ribossomal é o nucléolo, que aparece ligado às RONS. Como o nucléolo é constituído por proteínas ácidas e com alta afinidade por

prata, a simples utilização da técnica de impregnação argêntica é suficiente para visualizá-lo (Rufas et al., 1982). Neste trabalho, buscamos avaliar as características citogenéticas e populacionais do cromossomo B de *Metaleptea b. adspersa* oriundos do Pará e de Pernambuco afim de melhor caracterização deste polimorfismo. Além de inferir possíveis hipóteses evolutivas a respeito do conjunto cromossômico desta espécie comparando-o com populações analisadas anteriormente na Argentina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas de exemplares, obtenção e preservação de material

Ao todo, 79 indivíduos adultos machos de *Metaleptea b. adspersa* foram coletados em distintas localidades do Pará e Pernambuco (Tabela 1). Duas coletas foram realizadas em Belém-PA (Campus UFPA), em meados de 2009/2010 e 2014. Os espécimes receberam uma *overdose* de éter e em seguida foram retiradas as gônadas e uma das patas saltatórias de cada um dos gafanhotos para análise de cariótipo e DNA, respectivamente. Todas as amostras foram fixadas em uma solução de etanol e ácido acético (3:1) e estocados em freezer a -20°C em tubos de eppendorf.

Preparação de lâminas para análise convencional

As lâminas foram obtidas a partir da técnica de esmagamento folicular e coradas com orceína lacto acética 2% por cerca de cinco minutos. Em seguida, com o auxílio de um microscópio ótico, foi analisado o cariótipo de todos os indivíduos para averiguar a presença/ausência de cromossomos B. Células que continham o cromossomo B foram fotografadas utilizando uma câmera digital e montadas em Adobe Photoshop 6.0.

Bandeamento C

O bandeamento C seguiu a técnica de Sumner (1972) com as lâminas envelhecidas por dois dias, sendo submetidas a solução de ácido clorídrico (HCl 0,1N) por 30 min, Hidróxido de bário 5% (BaOH_2) por 18 seg e solução salina (2x SSC) por 45 min, estes dois últimos aquecidos a 60°C . Para corar o material foi usado Giemsa a 2% por 10 min. Células que continham o cromossomo B foram fotografadas utilizando uma câmera digital e montadas em Adobe Photoshop 6.0.

Impregnação com nitrato de prata

A impregnação com nitrato de prata foi realizada em lâminas envelhecidas em estufa a 37°C por pelo menos 48h. A técnica seguiu como proposto por Howell e Black (1980) com poucas modificações. As lâminas receberam duas gotas da solução aquosa de prata (0,5g de AgNO_3 e 1 ml de água formicada) e uma gota de gelatina. Em seguida, foram cobertas com lamínulas e incubadas em câmara úmida aquecida a 70°C por cerca de 2 min. Depois de analisadas, as células foram documentadas em câmera digital e as imagens montadas em Adobe Photoshop 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 79 exemplares obtidos e analisados, apenas seis deles continham o cromossomo extra em seu cariótipo, resultando em uma prevalência total de 7,6% (Tabela 1). Todos os gafanhotos portadores de cromossomo supernumerário foram oriundos da população de Belém-PA (campus UFPA) que apresentou uma prevalência representativa final de 14,28%. Nenhuma outra população analisada do Pará ou de Pernambuco apresentou cromossomo B, contudo, essa ausência pode estar ligada ao reduzido número de indivíduos coletados e não a inexistência de fato deste cromossomo em outras populações dos dois estados. Em outras duas espécies de gafanhotos que possuem cromossomo B, foram obtidas prevalências pequenas em diferentes populações. A espécie *Xyleus d. angulatus* (Romaleidae) apresentou uma prevalência de 7,21%, contudo em algumas populações de grande amostragem houve ausência desse polimorfismo (Machado *et al.*, 2014), já

Rhammatocerus brasiliensis (Acrididae) teve prevalência de 7,5%, 7,48% e 15,79% em diferentes populações e independente do tamanho da amostra em todas as populações de Pernambuco e da Bahia até então estudadas sempre mostraram a presença do polimorfismo (Loreto *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011).

Tabela 1. Locais de coletas, número de indivíduos analisados e prevalência do cromossomo B da espécie *Metaleptea brevicornis adspersa* nos Estados do Pará e Pernambuco (Brasil).

Localidade	Número de indivíduos	Indivíduos (0B)	Indivíduos (1B)	Prevalência
Belém (Campus UFPA) -PA 2009/2010	28	22	6	21,42%
Belém (Campus UFPA) -PA 2014	14	14	0	0%
Benevides-PA	10	10	0	0%
Bujarú-PA	1	1	0	0%
Inhangapi-PA	10	10	0	0%
Mosqueiro-PA	2	2	0	0%
Santa Barbara-PA	4	4	0	0%
Santa Izabel-PA	2	2	0	0%
Brejo dos Cavalos-PE	8	8	0	0%
Total	79	73	6	7,6%

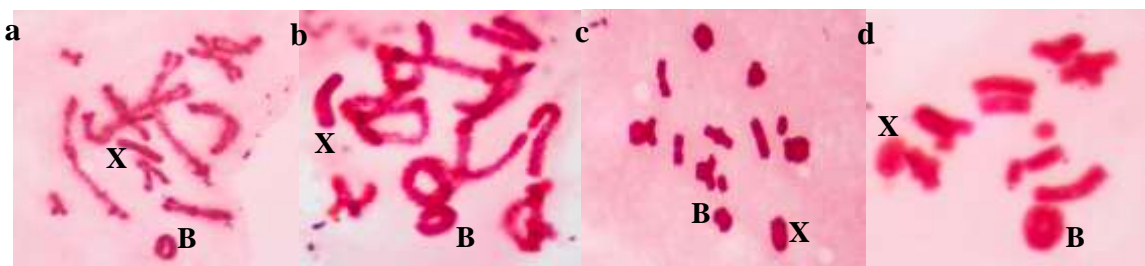


Figura 1: Células obtidas pela técnica convencional. Cromossomo B em anel heteropicnótico (a e b) e isopicnótico (c e d).

O cromossomo B de *Metaleptea brevicornis adspersa* tem morfologia metacêntrica e se apresentou em formato de anel ao longo da meiose I, caracterizando sua natureza de isocromossomo (Figura 1). O cromossomo B mostrou-se heteropicnótico positivo nas fases iniciais da prófase I (Figura 1 a e b) e, durante a fase de diacinese e metáfase I, este se comportou como isopicnótico (Figura 1 c e d), sendo reconhecido principalmente por seu formato em anel. Foi possível também, observar uma tendência do cromossomo extra de se deslocar para um dos polos da célula durante a metáfase I (Figura 2). Este comportamento também foi descrito por Bidau (1986) no isocromossomo B dos indivíduos desta espécie coletados na Argentina. Isto pode ser um indicativo de que tanto o cromossomo B de indivíduos da Argentina quanto dos indivíduos do Pará (Brasil) se tratam dos mesmos cromossomos B. Ao observar as lâminas tratadas pela técnica de bandeamento C, foi possível identificar blocos pericentroméricos de heterocromatina constitutiva em todos os cromossomos da espécie, inclusive no supernumerário (Figura 2). Em outros estudos semelhantes, o cromossomo B acrocêntrico do gafanhoto *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae) mostrou um pequeno bloco de heterocromatina constitutiva pericentromérico. Por outro lado, o cromossomo B de *Xyleus d. angulatus* (Romaleidae) contém muita

heterocromatina constitutiva com vários blocos dispostos ao longo do cromossomo (Loreto *et al.*, 2008).

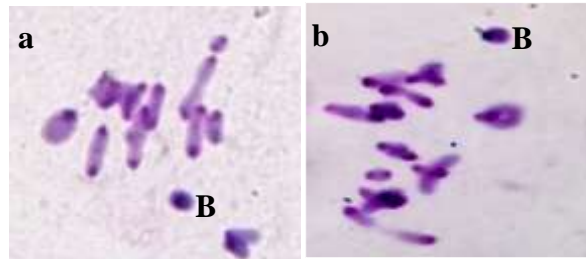


Figura 2: Bandeamento C evidenciando blocos de heterocromatina constitutiva pericentromérica do cromossomo B.

De forma a averiguar o número de RONS ativos no cariótipo da espécie foi utilizada a impregnação de nitrato, contudo, só foi possível observar as RONS em lâminas de indivíduos sem cromossomo B que mostraram apenas o bivalente P9 como portador de regiões organizadoras de nucléolo (RONS) (Figura 3). Um par de RONS é considerada a condição mais comum e basal em espécies de gafanhotos da família Acrididae (Cabrero e Camacho, 1986).

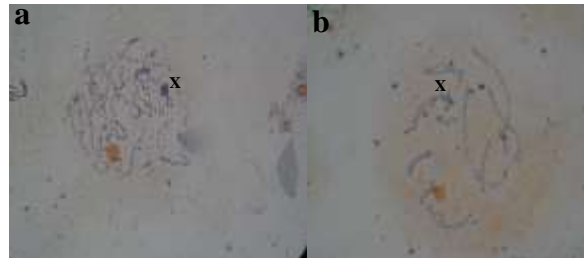


Figura 3: Impregnação por nitrato de prata evidenciando o nucléolo. Região intersticial do bivalente P9 contendo regiões organizadoras de nucléolos (seta).

CONCLUSÃO

Segundo as análises citogenéticas realizadas, o cromossomo B de *Metaleptea brevicornis adspersa* visto em populações do Brasil é o mesmo que foi documentado na Argentina. A caracterização realizada é relevante para entender melhor o comportamento dos cromossomos extras e inferir a sua função no genoma desta espécie. Para se ter um melhor conhecimento sobre a natureza desse cromossomo B e sua distribuição é necessário um maior número de espécimes coletados e um estudo molecular mais aplicado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Fernando Silva que enviou uma parte de nossas amostras. Agradecemos também a Cirlene Silva pelo suporte técnico durante o desenvolvimento do projeto. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FACEPE (Fundação de Amparo a pesquisa do estado de Pernambuco) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Bidau, C.J. (1986). Effects on cytokinesis and sperm formation of a B-isochromosome in *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acridinae, Acrididae). *Caryologia* 38: 165-177.
- Cabrero J., Camacho JPM (1986) Cytogenetic studies in gomphocerine grasshoppers. II. Chromosomal location of active nucleolar organizing regions. *Can J Genet Cytol* 28:540-544.
- Camacho, J.P.M., Sharbel, T.E. and Beukeboom, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 163-178.
- Carbonell, C. S. (1997). Origin, evolution and distribution of the Neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): A preliminary hypothesis. *Revista de la sociedad Entomológica Argentina*, Tomo, 36 (1-4): 153-175

- Henriques-Gil, N., Santos, J.L. and Arana, P. (1984). Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 89: 290-293.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Loreto, V., López-León MD, Cabrero, J., Camacho, JPM and Souza, MJ. (2008). Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research*. 16: 233-241.
- Machado, CB, Silva-Neto, LC., Loreto, V. and Souza, MJ. (2014). B chromosome prevalence and physical mapping of 18S rDNA and H4 histone sites in the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae). *Genetic and Mol. Res.*
- Oliveira, N. Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, Loreto V, Martins C, Moura RC. (2011). Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): Extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Molecular Cytogenetics* 4: 24-.
- Rufas JS, Iturra P, de Souza W, Esponda P (1982) Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizer under light and electron microscopy. *Arch Biol* 93:267-274
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.