

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE TRÊS ESPÉCIES CRÍPTICAS DO GRUPO *WILLISTONI* DE *DROSOPHILA* DA FLORESTA ATLÂNTICA

Jaqueline Alves Nery de Mendonça¹; Claudia Rohde²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas CAV-UFPE; E-mail: jaquemendonca@outlook.com, ²Claudia Rohde/Pesquisadora do Núcleo de Biologia CAV-UFPE; E-mail: claudiaufpe@gmail.com

Sumário: Rearranjos presentes nos cromossomos politênicos das espécies de drosofilídeos do subgrupo da *Drosophila willistoni* foram aqui investigados a fim de contribuir para o estudo da diversidade na espécie. Cinco coletas foram realizadas em fragmentos de Floresta Atlântica da Paraíba, Pernambuco e Bahia. A identificação taxonômica das espécies crípticas do subgrupo *willistoni* foi realizada em 255 linhagens, para selecionar as que seriam estudadas do ponto de vista cromossômico. Os resultados indicaram a presença de *D. willistoni* e *D. paulistorum*, sendo esta última a espécie menos abundante (9,8%). O polimorfismo de rearranjos cromossômicos do tipo inversões paracêntricas foi feito para quatro inversões em *D. willistoni* (IIL-A, IIL-F, IIR-E e III-J) indicando um baixo número de inversões por fêmea (média = 1,9), que é mais similar a populações da Amazônia, do que a populações mais polimórficas, do Centro e Sul do Brasil.

Palavras-chave: cromossomos politênicos; distribuição; drosofilídeos; Floresta Atlântica

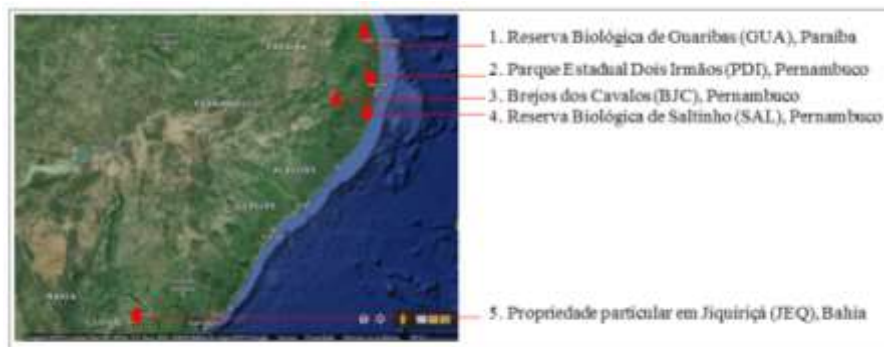
Introdução

O grupo da *Drosophila willistoni* pertence subgênero *Sophophora* e gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) e é constituído de 24 espécies que se agrupam em crípticas e não crípticas. Espécies crípticas se caracterizam por serem reprodutivamente isoladas, mas muito semelhantes morfologicamente entre si. Diferentes metodologias permitem a identificação das espécies, porém a preparação de estruturas internas da genitália dos machos adultos, ainda é a mais utilizada. Drosofilídeos são importantes modelos de estudo em diversas áreas. Uma das manifestações da plasticidade genética destes pequenos insetos é a existência dos rearranjos cromossômicos, que são do tipo inversões paracêntricas, que podem ser facilmente visualizados nos cromossomos politênicos, principalmente em células da glândula salivar. Pela presença e frequência dos rearranjos nos cromossomos é possível caracterizar geneticamente as diferentes populações geográficas de cada espécie, motivando importantes estudos de genética ecológica, diversidade genética e evolução cromossômica. Caracterizar cromossomicamente as diferentes espécies do subgrupo *willistoni* representa o primeiro passo para atingir o objetivo maior que é inventariar a diversidade genética entre populações geográficas e compreender suas formas de adaptação. Para isso, um melhor conhecimento da distribuição das espécies na natureza, em conjunto com a caracterização do nível da variabilidade genética, investigada através dos rearranjos cromossômicos, foi o objetivo deste estudo, realizado em fragmentos de Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil.

Materiais e Métodos

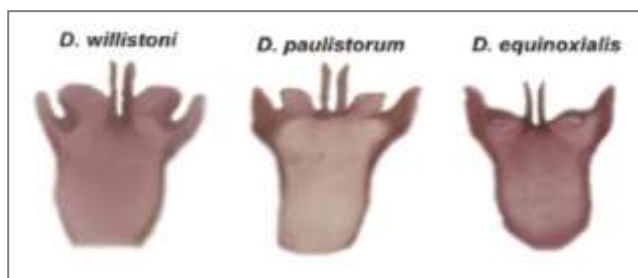
Foram realizadas cinco coletas de drosofilídeos em ambientes de Floresta Atlântica (**Figura 1**) através do uso de 20 armadilhas, contendo isca de banana, e mantidas nos locais por dois dias. As coletas foram realizadas entre fevereiro e abril de 2014.

Figura 1. Locais de coleta plotados sobre o mapa parcial da região do Nordeste do Brasil.



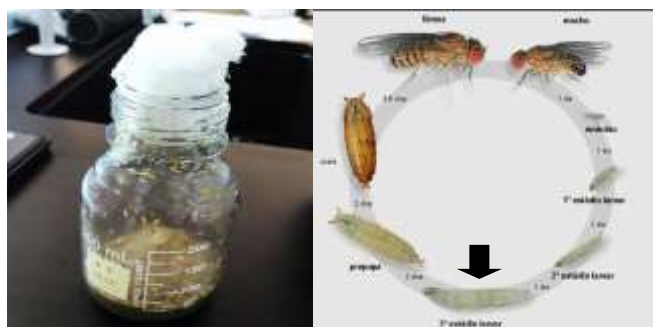
Do total de adultos coletados nos cinco fragmentos de floresta, foram separadas e cultivadas individualmente 255 linhagens, classificadas pela morfologia externa como pertencentes ao subgrupo *willistoni*. Para a identificação final das espécies crípticas, machos adultos foram selecionados à medida que as linhagens se estabeleciam e eram cultivadas em laboratório (descendentes de uma única fêmea coletada). Os machos tiveram suas genitálias preparadas para a identificação, sendo três as possibilidades de ocorrência na região Nordeste: *Drosophila willistoni*, *D. paulistorum* ou *D. equinoxialis*. Para a distinção entre as espécies foram dissecadas as estruturas reprodutivas (hipândrio) de 255 machos, sendo cada uma analisada ao microscópio estereoscópico (lupa). Os padrões das estruturas foram fotografados e analisados, sendo por fim comparados ao padrão estabelecido por Rohde et al. (2010) conforme **Figura 2**.

Figura 2. Padrões do hipândrio das três espécies crípticas (Rohde et al., 2010).



Uma pequena parcela das linhagens estabelecidas e identificadas como *Drosophila willistoni* (cerca de 20 de cada população) foram submetidas à análise dos rearranjos presentes nos cromossomos politênicos, em células da glândula salivar, de larvas em terceiro estágio (**Figura 3**). As linhagens de *D. willistoni* foram submetidas ao cultivo em ambiente a 18°C, em vidros contendo meio de cultivo padrão e diversos outros nutrientes, aprimorado ao longo deste projeto, como a inclusão de levedura, banana e purê de batata. Com este meio rico foi possível obter larvas em terceiro estágio bem nutridas e com células da glândula salivar de bom tamanho, para a extração dos cromossomos politênicos.

Figura 3. Meio de cultivo das larvas, e os estágios de desenvolvimento de *Drosophila*, com destaque ao terceiro estágio larval (seta), quando os cromossomos politênicos estão melhor desenvolvidos, nas células da glândula salivar.



Para a preparação dos cromossomos politênicos foi feita a dissecção da glândula em soro fisiológico, fixação em ácido acético 45%, tratamento hipotônico (ácido acético/ácido

lático/água), e aplicação de coranteorceína (**Figura 4**). Os cromossomos politênicos e seus rearranjos foram observados e fotografados em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i, com contraste de fase e aumento de 1.000x. As imagens obtidas foram copiadas em papel e os padrões das bandas de cada cromossomo foram comparados ao fotomapa e imagens das inversões descritas na revisão de Rohde e Valente (2012) para a espécie *D. willistoni*. Na próxima seção são apresentados os resultados para os autossomos (cromossomos II e III) já que o cromossomo X não apresentou variações. Os resultados são parciais e terão continuidade ao longo de 2015/2016.

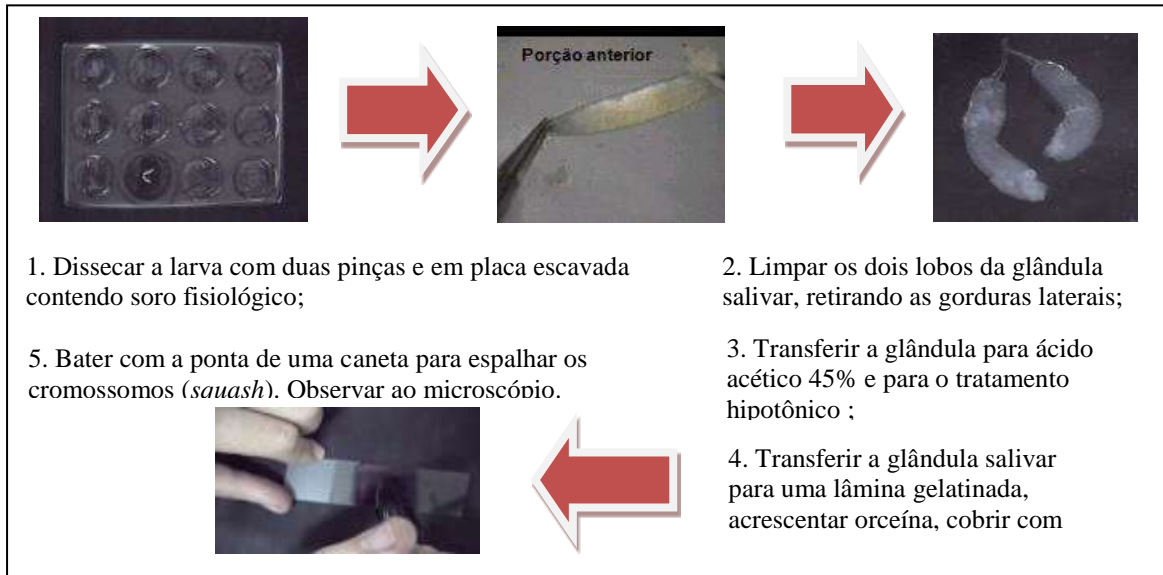


Figura4. Etapas da preparação dos cromossomos politênicos a partir da glândula salivar.

Resultados e Discussão

Em todas as amostragens dos fragmentos de Floresta Atlântica, *Drosophila willistoni* foi a espécie mais abundante, seguida da *D. paulistorum*. A espécie *D. equinoxialis* não foi coletada. Entre os 255 indivíduos do grupo críptico identificados, apenas 25 foram *D. paulistorum* (9,8%) e 230 foram *D. willistoni*. As frequências das duas espécies em cada local estão indicadas na **Figura 5**. PDI foi o local com maior abundância da primeira espécie; e JEQ e GUA os locais com maior abundância da segunda.

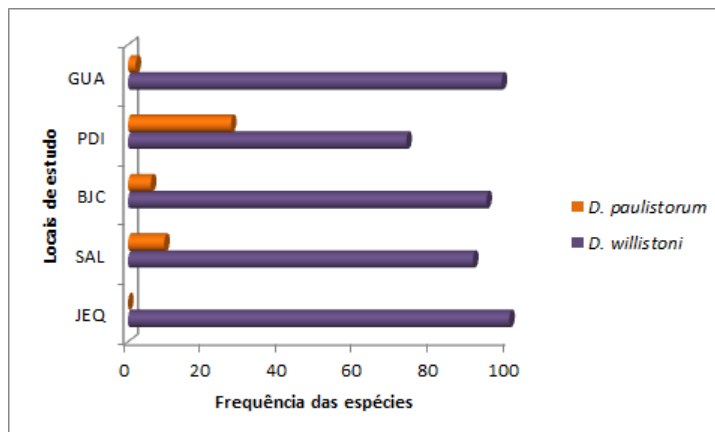


Figura 5. Frequência das espécies entre o total das linhagens crípticas do grupo *willistoni* estabelecidas.

Os rearranjos cromossômicos foram analisados até o momento em 17 linhagens de *D. willistoni* e os resultados das frequências das inversões encontradas nos autossomos estão apresentados na **Tabela 1**. Para fins comparativos, na tabela estão não só os resultados

obtidos neste estudo (PDI, SAL e JEQ), mas também os obtidos por Rohde e Valente (2012), para o local ZOO (Zoológico Dois Irmãos) e para CAT (Parque Nacional do Catimbau). No cálculo das frequências, as inversões em homozigose foram contadas duas vezes e as em heterozigose, foram contadas uma vez. Apenas quatro rearranjos (IIL-A, IIL-F, IIR-E e III-J) foram detectados nas populações até o momento, porém cada um está em frequências elevadas (exceto IIL-A). Entretanto, no conjunto, as populações do Nordeste avaliadas têm baixa frequência de rearranjos (média de 1,9 inversões por linhagem analisada).

Tabela 1. Frequências de quatro diferentes inversões encontradas nas três populações deste estudo (PDI, SAL e JEQ).

Inversões	PDI	ZOO*	CAT*	SAL	JEQ
IIL-A	0	0	5	0	16,7
IIL-F	17,0	13,6	5,0	27,2	0
IIR-E	66,7	59,1	65,0	45,4	0
III-J	33,3	54,5	35,0	31,8	33,33

*ZOO (Zoológico Dois Irmãos) e CAT (Pq. Nac. do Catimbau) são resultados de Rohde e Valente (2012).

Cabe destacar que há grande carência de estudos sobre a variabilidade cromossômica nas populações de *D. willistoni* da região Nordeste e por isso, os resultados obtidos até o momento só puderam ser comprados aos de Rohde e Valente (2012) que estudaram uma população da Floresta Atlântica (ZOO) e uma da Caatinga (CAT) em Pernambuco. Uma representação gráfica dos resultados e da comparação de todas as informações pode ser visualizada na **Figura 6**.

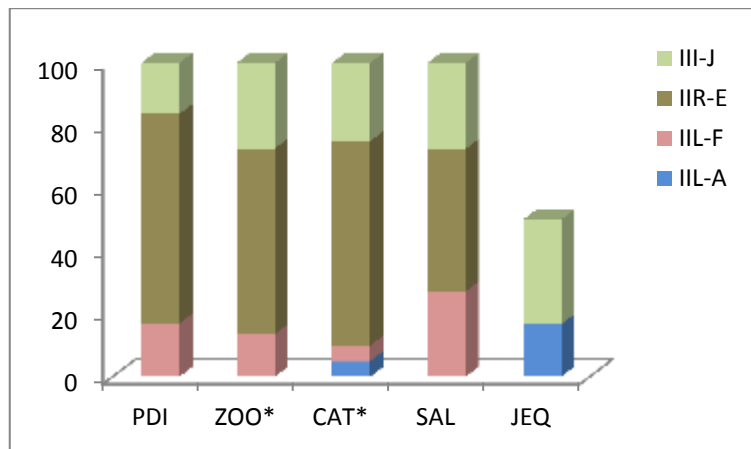


Figura 6. Frequência das inversões por população de *D. willistoni*. * dados de Rohde e Valente (2012).

Conclusões

Com base nos relatos iniciais deste trabalho, sabe-se que as populações de *D. willistoni* são abundantes na região Nordeste, apresentam variabilidade genética na forma de inversões cromossômicas, e precisam ser ricamente investigadas para a melhor compreensão da ecologia, genética e evolução, na região Neotropical.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CNPq e PROPESQ-UFPE pelos auxílios financeiros e bolsa recebida; e aos colaboradores Zilpa Melo, Geórgia Oliveira, Robervânia Moura, Rita Silva e Ana Garcia.

Referências

ROHDE C, VALENTE VLS **Genetics and Molecular Biology** v. 35, p. 966-979, 2012.
ROHDE C, et al. **Drosophila Information Service** v. 93, p. 118-122, 2010.