UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JOSÉ DANIEL PEREIRA DO NASCIMENTO

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES RIBOSSOMAIS E HISTONA H3 EM GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE

Recife

2024

JOSÉ DANIEL PEREIRA DO NASCIMENTO

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES RIBOSSOMAIS E HISTONA H3 EM GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Drª Vilma Loreto da Silva
Coorientador: Mestre Thiago Nascimento

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Nascimento, José Daniel Pereira do.
Mapeamento Cromossômico de Genes Ribossomais e Histona H3 em Gafanhotos da Família Romaleidae / José Daniel Pereira do Nascimento. - Recife, 2024.
53 p. : il., tab.

Orientador(a): Vilma Loreto da Silva
Cooorientador(a): Thiago Henrique do Nascimento
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

1. Citogenética. 2. Mapeamento Cromossômico. 3. Família Romaleidae. 4. Hibridização in situ FISH. 5. Famílias multigênicas. I. Silva, Vilma Loreto da. (Orientação). II. Nascimento, Thiago Henrique do . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

JOSÉ DANIEL PEREIRA DO NASCIMENTO

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE GENES RIBOSSOMAIS E HISTONA H3 EM GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 05 / 03 /2024

BANCA EXAMINADORA

_____

Drª Vilma Loreto da Silva / UFPE

_____

Drª Andrea Pedrosa Harand / UFPE

_____

Dr Marcos da Silveira Regueira Neto / Promega Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todos que contribuíram para o sucesso deste trabalho e para a conclusão desta importante etapa da minha vida acadêmica. Expresso minha gratidão da seguinte maneira:

Primeiramente, quero expressar minha profunda gratidão à Professora Vilma Loreto. Sua orientação ao longo da minha formação foi essencial, não apenas neste momento, mas em todo o percurso. Agradeço a paciência, pelos valiosos ensinamentos, sugestões e pelos materiais cedidos, que desempenharam um papel fundamental na realização deste trabalho.

A Thiago Nascimento, meu sincero agradecimento pela orientação durante o tempo que passei no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal. Sua paciência, atenção e ensinamentos foram fundamentais para a conclusão deste estudo.

À Professora Andreia Pedrosa, agradeço por me acolher no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, fornecendo todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

Expresso minha gratidão a todos que fazem e fizeram parte do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal. Agradeço o acolhimento, tratamento amável e valiosas orientações recebidas ao longo do período em que estive envolvido no projeto.

Aos membros do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), agradeço a convivência, brincadeiras, disposição em ajudar, confraternizações e conversas que tornaram o LGCAH um ambiente enriquecedor para o trabalho.

À minha amiga Marcelye, meu sincero agradecimento pela paciência, ensinamentos e apoio nos momentos de maior estresse. É uma grande alegria poder contar com a consideração e amizade de alguém tão especial.

À minha mãe, minha avó, meus irmãos e minha namorada, expresso minha profunda gratidão pelo apoio constante, pelos conselhos dados, pela força nos momentos de fraqueza, e pelo incentivo que foi fundamental para a conclusão desta etapa da minha vida.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), agradeço pelo financiamento do projeto, pela bolsa de iniciação científica e pelo auxílio financeiro que tornaram possível a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos que contribuíram de alguma forma. Seu apoio foi crucial e sou profundamente grato por cada colaboração.

RESUMO

A família Romaleidae (superfamília Acridoidea) compreende ~437 espécies de gafanhotos organizadas em cerca de 80 gêneros e 3 subfamílias com distribuição Neotropical. A morfologia dos gafanhotos da família Romaleidae é distinta, destacando-se como os maiores em tamanho descritos na natureza, apresentam diversidade em cores e formas, além da capacidade de produzir sons por meio de estridulação nas asas. Os cariótipos desse grupo de insetos é composto em sua maioria por 2n = 23, 24 X0:XX, e a presença de cromossomos acrocêntricos. Os estudos de caracterização dos genomas de indivíduos pertencentes à família Romaleidae descrevem uma composição considerável de DNA repetitivo em tandem como DNAs satélites, minissatélites, microssatélites, além de DNA repetitivo disperso, como transposons e retrotransposons. A técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH, do inglês Fluorescente *in situ* Hybridization) tem sido aplicada para investigar a distribuição de sequências repetitivas, ajudando a elucidar padrões de evolução cromossômica em diferentes espécies. O objetivo deste estudo foi identificar e comparar o número e a distribuição de sítios de DNA ribossomal e de histona H3 em espécies de gafanhotos da família. Após a técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH), identificaram-se loci de DNAr 45S nas regiões pericentroméricas dos pares cromossômicos S10 em *Agriacris auripennis*, M7 em *Prionolopha serrata* e *Epiprora hilaris*, e M6 em *Phaeoparia megacephala*. A sonda H3 foi mapeada nas regiões pericentroméricas do cromossomo S9 de *Agriacris auripennis*, M9 de *Prionolopha serrata* e *Phaeoparia megacephala*, e M7 de *Epiprora hilaris*. Os resultados indicam semelhança no número de loci de DNAr 45S e sítios de H3, mas diferem em suas localizações, sugerindo ocorrência de rearranjos cromossômicos e variação na evolução cromossômica do grupo.

PALAVRAS-CHAVE: FISH, Heterocromatina, Citogenética, Gafanhoto

ABSTRACT

The family Romaleidae (superfamily Acrididae) comprises approximately 437 species of grasshoppers organized into about 80 genera and 3 subfamilies with Neotropical distribution. The morphology of Romaleidae grasshoppers is distinctive, being the largest in size described in nature, displaying diversity in colors and shapes, as well as the ability to produce sounds through stridulation on their wings. The karyotypes of this group of insects mostly consist of 2n = 23, 24 X0: XX, with the presence of acrocentric chromosomes. Studies characterizing the genomes of individuals belonging to the Romaleidae family describe a considerable composition of repetitive DNA, such as satellite DNAs, minisatellites, microsatellites, as well as dispersed repetitive DNA, such as transposons and retrotransposons. The Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique has been applied to investigate the distribution of repetitive sequences, helping to elucidate patterns of chromosomal evolution in different species. The aim of this study was to identify and compare the number and distribution of ribosomal DNA and histone H3 sites in grasshopper species of the family. After the Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) technique, 45S rDNA loci were identified in the pericentromeric regions of chromosomal pairs S10 in *Agriacris auripennis*, M7 in *Prionolopha serrata* and *Epiprora hilaris*, and M6 in *Phaeoparia megacephala*. The H3 probe was mapped to the pericentromeric regions of chromosome S9 in *Agriacris auripennis*, M9 in *Prionolopha serrata* and *Phaeoparia megacephala*, and M7 in *Epiprora hilaris*. The results indicate similarity in the number of 45S rDNA loci and H3 sites, but differ in their locations, suggesting the occurrence of chromosomal rearrangements and variation in the chromosomal evolution of the group.

KEYWORDS: FISH, Heterochromatin, Cytogenetics, Grasshopper

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 1 Coloração convencional em células meióticas de diferentes espécies de Romaleidae. *Agriacris auripennis* (metáfase l) (a), *Prionolopha serrata* (metáfase l) (b), *Epiprora hilaris* (diplóteno) (c) e *Phaeoparia megacephala* (metáfase l) (d) apresentam cariótipo com 2n= 23, X0 (macho).

FIGURA 2 Coloração sequencial CMA/ DAPI identificando as regiões CMA3 + em Prionolopha serrata (Diplóteno) (M4, M7, M9 e X) (a), Epiprora hilaris (Metáfase l) (M7) (b), Agriacris auripennis (Paquíteno) (M8, P9 e P10) (c) e Phaeoparia megacephala (Paquíteno) (Todos) (d).

FIGURA 3 Hibridização in situ fluorescente usando sondas DNAr35S (verde) e H3 (vermelho) em Prionolopha serrata (Diplóteno) (35s: M7, H3: M9) (a), Epiprora hilaris (Metáfase l) (35s: M7, H3: M7) (b), Agriacris auripennis (Paquíteno) (35s: P10, H3: P9) (c) e Phaeoparia megacephala (Paquíteno) (35s: M6, H3: M8) (d).

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 Número cromossômico, mecanismo de determinação do sexo e morfologia cromossômica em gafanhotos representantes da família Romaleidae

TABELA 2 Padrão da HC com fluorocromos base-específicos na família Romaleidae. "*" Homogêneo nos cromossomos; "-" não foi encontrada essa informação na literatura; "x" não possui pares de cromossomos com essa característica; "T" todos os cromossomos; "G" cromossomo grande; "M" cromossomo médio; "P" cromossomo pequeno

TABELA 3 Padrão de genes ribossomais e histonas por hibridização *in Situ* (FISH) na família Romaleidae. "*" Homogêneo nos cromossomos; "-" não foi encontrada essa informação na literatura; "x" não possui pares de cromossomos com essa característica; "T" todos os cromossomos; "G" cromossomo grande; "M" cromossomo médio; "P" cromossomo pequeno

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**.....11
2. **REVISÃO DA LITERATURA**.....12
2.1 DISTRIBUIÇÃO E ECOLOGIA DA FAMÍLIA ROMALEIDAE.....12
2.2 MORFOLOGIA DOS GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE 15
2.3 CARACTERÍSTICAS CARIOTIPICAS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE.....16
2.4 ANÁLISE DA HC COM FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS NA FAMÍLIA ROMALEIDAE 19
2.5 GENES RIBOSSOMAIS: DNAR18S E 5S 22
2.6 GENES HISTONA.....25
2.7 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU (FISH) EM GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE. 26
3. **OBJETIVO** 30
3.1 OBJETIVO GERAL.....30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....30
4. **CAPÍTULO 1** 32
5. **REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA** 50

1. INTRODUÇÃO

A família Romaleidae destaca-se como um dos maiores e mais diversificados grupos de gafanhotos, compreendendo mais de 437 espécies distribuídas em 80 gêneros e 3 subfamílias, com distribuição Neotropical (Carbonell, 1977; Braga, 2015). Este grupo é notável pela presença de um cariótipo diploide *2n* = 23, 24 X0:XX, composto em sua maioria por cromossomos acrocêntricos (Mesa *et al*., 1982). Os cariótipos das espécies estudadas pertencentes a família Romaleidae, revelam até o momento variações numéricas em espécies de *Xyleus e Zoniopoda*, devido a polimorfismos como cromossomo B (Bernardino, 2015). Além disso, a família Romaleidae exibe uma significativa abundância de DNA repetitivo em seu genoma, incluindo satélites, minissatélites e microssatélites, e DNA repetitivo disperso, como transposons e retrotransposons (Martíns, 2004).

Os sítios de RNA ribossomal são compostos por sequências repetidas que geralmente se organizam em tandem no genoma e são os principais componentes das regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Em insetos, essa família é caracterizada pela associação de três subunidades (28S, 18S e 5.8S), derivadas do gene precursor 45S. Essas subunidades passam por transcrição, processamento e montagem em unidades ribossomais (Lamond, 1998), com genes separados por espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2). Estudos sobre os genes de DNAr têm sido amplamente realizados em vários grupos de organismos, incluindo gafanhotos. A introdução da Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) possibilitou a detecção de sítios adicionais de DNA ribossomal, não acessíveis outrora por técnicas convencionais, como a impregnação por nitrato de prata. No caso de Romaleidae, o estudo de sequências ribossomais por FISH tem sido restrito, sendo analisadas apenas para algumas *Xestotrachelus robustus, Brasilacris gigas*, *C. nuptialis* e *C. speciosa* (Souza *et al*., 1998, 2003; Reguei, Neto *et al*., 2013).

A família multigenicas responsável pela síntese de Histona é organizada em uma sequência repetitiva em tandem (Barzotti *et al*., 2000). A cromatina é composta por moléculas de DNA organizadas em torno de proteínas histônicas como H1, H2A, H2B, H3 e H4, formando subunidades conhecidas como nucleossomos. Duas cópias das

proteínas H2A, H2B, H3 e H4 se agrupam para formar o nucleossomo, enquanto a histona H1 atua como ponte de DNA, conectando um nucleossomo ao outro (Albig *et al*., 1996). Estudos recentes, utilizando a técnica de FISH, têm examinado a distribuição dos genes das histonas em diversos grupos de organismos vertebrados e invertebrados, revelando variações na presença desses genes em autossomos (por exemplo, bivalves) ou em múltiplos autossomos (por exemplo, humanos) (Albig *et al*., 1996). Dentre as proteínas histônicas, a distribuição de H3 e H4 têm sido melhor investigadas em estudos citogenéticos, buscando compreender sua alta conservação nos gafanhotos e em outros organismos. Trinta e cinco espécies de gafanhotos da família Acrididae tiveram seus cromossomos mapeados para os genes de histonas H3 e H4, todos localizados em um único par cromossômico (Cabrero *et al*., 2009). Algumas espécies de Romaleidae, como *Xyleus d. angulatus* (Machado *et al*., 2014), *Brasilacris gigas*, *Chromacris nuptialis*, *C. speciosa* e *Xestotrachelus robustus* (Neto *et al*., 2013), também tiveram os genes H3 e H4 mapeados em seus cromossomos. Essas análises forneceram informações importantes sobre a conservação e a distribuição desses genes em diferentes linhagens evolutivas para a família.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DISTRIBUIÇÃO E ECOLOGIA DA FAMÍLIA ROMALEIDAE

A família Romaleidae, a segunda maior família neotropical de gafanhotos, exibe uma notável diversidade e adaptação a uma variedade de ambientes, composta por aproximadamente 80 gêneros e 430 espécies de gafanhotos (BRAGA et al., 2015). Esta família pertence à superfamília *Acridoidea* e está subdividida em três subfamílias distintas: Romaleinae, *Aucacrinae e Trybliophorinae*. Sua presença é marcante na América do Sul e América Central, com a América do Sul sendo considerada o provável local de origem (Barreto, 2009).

A distribuição geográfica da família Romaleidae é amplamente diversificada, com a maior parte de seus representantes distribuídos na região Neotropical, enquanto no sul da região Neártica são registradas poucas espécies (Amedegnato, 1974; Carbonell, 1977). Gêneros como *Brasilacris, Radacridium, Helionotus, Staleochlora e Xyleus* são predominantes em regiões semiáridas, enquanto *Chromacris*, *Tropidacris*,

Agriacris, e a maioria dos representantes da tribo *Phaeopariini*, além de alguns do gênero *Zoniopoda,* ocupam as florestas tropicais úmidas (Carbonell, 1977, 1984, 1986, 2002, 2007; Roberts, 1982, 1992).

A ampla distribuição da família Romaleidae na região Neotropical é corroborada por estudos que revelam a presença de mais de 437 espécies em todo o continente, com representantes desde a Argentina até o México (Carbonell, 1977; Braga *et al*., 2015). O Brasil, por sua vez, abriga cerca de 168 espécies, com uma distribuição significativa em todas as regiões, destacando-se especialmente no Norte e Nordeste do país.

A presença dos Romaleideos no nordeste do Brasil é notável, onde esses gafanhotos podem ser encontrados desde a mata atlântica até a caatinga, demonstrando sua capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas (Carbonell, 1977). A diversidade de espécies na região é evidenciada por mais de 15 espécies relatadas, incluindo representantes notáveis como *Radacridium, Xyleus discoideus angulatus* e o gênero *Brasilacris*, que é exclusivo desta área (Souza e Kido, 1995).

No contexto brasileiro, uma pesquisa na região metropolitana de Belém, no Estado do Pará, identificou diversas espécies de Romaleidae, destacando-se *Chromacris speciosa, Prionolopha serrata e Tropidacris collaris* entre as 12 relatadas, evidenciando a abundância e diversidade desses gafanhotos na região (Braga *et al*., 2015).

Diversos gêneros de gafanhotos pertencentes à família Romaleidae se destacam pela abundância de espécies como o gênero *Chromacris*, sendo minuciosamente revisado por Roberts e Carbonell (1982), evidenciando uma relação entre suas características morfológicas e uma distribuição exclusivamente neotropical, abrangendo desde o México até a Argentina. O gênero *Chromacris* foi subdividido em dois grupos por Roberts e Carbonell (1982): o grupo trogon, que engloba as espécies *C. trogon, C. psittacus, C. icterus e C. peruvianaII*; e o grupo *colorata*, composto por *C. colorata, C. minuata, C. miles, C. speciosa e C. nuptialis*. *Tropidacris* (Romaleinae), com uma distribuição abrangente do sudoeste do México à região central da Argentina, destaca-se pela presença de três espécies: *T. descampsi, T. collaris e T. cristata*, esta última com três subespécies distintas (*T. c. cristata, T. c. dux e T. c. grandis*). *Tropidacris* é

notável por sua importância econômica como praga agrícola, afetando várias espécies cultivadas. Revisões recentes têm contribuído para o entendimento da taxonomia e distribuição geográfica na família Romaleidae, além da descrição de novas espécies. Esse foi o caso do gênero *Radacridium* (Romaleinae), endêmico da região Nordeste do Brasil, que atualmente compreende três espécies: *R*. *nordestinum* distribuído nos estados da Paraíba, Pernambuco e Bahia; *R. adamantinum e R. mariajoseae* na Bahia e Pernambuco, respectivamente (Carbonell, 1986). Phaeopariini, uma tribo de Romaleinae, consiste em 11 gêneros, 37 espécies e cinco subespécies, predominantemente distribuídos na região Amazônica (Carbonell, 2002).

Quanto ao gênero *Xyleus*, uma análise realizada por Carbonell (2004) revelou uma ampla distribuição geográfica, abrangendo áreas do sudoeste do México, América Central, Colômbia, Equador, Venezuela, Brasil, Paraguai, Uruguai, parte da Argentina, Bolívia e Peru. No gênero *Xyleus*, foram descritas 21 espécies, incluindo cinco subespécies de *Xyleus discoideus (X. d. discoideus, X. d. angulatus, X. d. mexicanus, X. d. venezuelae, X. d. rosulentus)*. Destaca-se a ampla distribuição da subespécie *Xyleus discoideus angulatus* na região Nordeste do Brasil.

Os gafanhotos além de possuírem uma grande diversidade em sua distribuição também possuem uma grande diversidade em relação a seus hábitos alimentares. Segundo Maranhão (1976), os gafanhotos, insetos herbívoros por natureza, têm seu hábito alimentar como um ponto central de sua biologia. Sua dieta é diversificada, abrangendo folhas, brotos, flores e até mesmo plantas cultivadas. Essa variabilidade na alimentação é influenciada pela espécie e pelas condições ambientais locais. Além disso, a disponibilidade de alimentos desempenha um papel crucial na determinação da dieta específica dos gafanhotos em determinadas circunstâncias.

Em muitas áreas agrícolas, alguns gafanhotos Romaleideos são classificados como pragas, representando uma ameaça significativa para as plantações. Seu apetite voraz pode resultar em danos consideráveis, pois consomem grandes quantidades de vegetação, prejudicando a produção agrícola. Essa característica torna-os economicamente importantes do ponto de vista agrícola, conforme observado por Fernandes (2018).

No entanto, é essencial reconhecer que os gafanhotos não são exclusivamente prejudiciais. Na dinâmica dos ecossistemas, esses insetos desempenham um papel crucial como presas para outros animais, contribuindo para o equilíbrio das populações de diferentes espécies. Assim, enquanto em certos ambientes os gafanhotos podem se tornar uma praga significativa, em outros, sua presença é fundamental para manter uma cadeia alimentar equilibrada (Bittar, 2016).

O estudo de Maranhão (1976) destaca a variabilidade no regime alimentar dos ortópteros, indo desde a monofagia até a polifagia. Embora a fitofagia predomine, evidenciando sua nocividade para as plantas cultivadas, essa diversidade alimentar ressalta a complexidade da interação entre os gafanhotos e seu ambiente. Assim, compreender a ecologia desses insetos é crucial para implementar estratégias de manejo que equilibrem sua presença e minimizem os impactos negativos em áreas agrícolas.

2.2 MORFOLOGIA DOS GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE

A família Romaleidae é composta por gafanhotos que exibem uma notável diversidade em termos de cores, tamanhos e formas, apresentando características únicas que os distinguem na classe Insecta. Dentre os representantes dessa família, alguns são reconhecidos como os maiores gafanhotos da natureza, não apenas em termos de tamanho, mas também em relação ao corpo e biomassa (Triplehorn, 2011).

Esses gafanhotos podem ser classificados como alados, braquípteros ou macrópteros, e suas características morfológicas incluem variações na cabeça, que pode orthognata ou opistognata. Destacam-se por possuírem um espinho apical na face externa das tíbias posteriores, sendo esse um traço distintivo facilmente identificável nas espécies pertencentes à família (Triplehorn, 2011). A presença do último espinho imóvel sobre o ápice da tíbia posterior é uma característica marcante (Rosalles, 1996).

Os gafanhotos da família Romaleidae são notáveis não apenas pelo seu tamanho impressionante, mas também pela capacidade de produzir sons, uma característica

única entre as famílias de gafanhotos que habitam as copas das árvores. Essa habilidade é atribuída a um mecanismo de estridulação, no qual bordas localizadas nas asas posteriores e na parte inferior das asas anteriores geram sons quando friccionadas. Nos dias ensolarados, os machos utilizam esse mecanismo para produzir sons distintos e destacados (Riede, 1987).

2.3 CARACTERÍSTICAS CARIOTIPICAS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE

Os gafanhotos pertencentes à família Romaleidae se destacam pela estabilidade em seu número cromossômico, sendo notável a prevalência do cariótipo diploide 2n = 23, X0 em machos e 2n = 24, XX em fêmeas, caracterizado por cromossomos acrocêntricos (Mesa *et al*., 1982), sendo 2-4 cromossomos grandes, de 5-7 médios e de 2 a 3 pequenos, como podemos observar em *Brasilacris gigas, Chromacris speciosa e Xestotrachelus robustus* (Neto *et al*., 2013). Em sua pesquisa intitulada "Cariología de los acridoideos neotropicales: Estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones", Mesa descreveu o número cromossômico de 43 espécies (Tabela 1). Dentro das 43 espécies analisadas na família Romaleidae, observou-se que em três delas (*Diponthus communis*, *Xyleus laevipes* e *Zoniopoda iheringi*), ocorreram fusões X-autossomo independentes, resultando em uma redução do cariótipo para 2n=22. Vale ressaltar que, nesses casos, a fusão foi do tipo X-autossomo, originou também o mecanismo sexual XY:XX nessas espécies. No gênero *Diponthus*, especificamente em três das sete espécies analisadas *(Diponthus dispar, D. electus e D. maculiferus*), foi identificado um cromossomo metacêntrico. Essa característica sugere a provável origem a partir de uma única fusão autossômica, levando a uma redução no número diploide para 21,22 X0:XX. Desde este trabalho, muitos outros cariótipos foram descritos na família Romaleidae (Tabela 1). Nos últimos anos novos cariótipos de sete espécies foram identificados, com todas as espécies apresentando o número cromossômico e sistema sexual típico da família (Souza e Silva-Filha, 1993; Souza e Kido, 1995; Rocha, 1997; Pereira e Souza, 2000; Neto *et al*, 2013).

O estudo do cariótipo da espécie *Xestotrachelus robustus* revelou características distintivas em sua estrutura cromossômica. A análise citogenética destacou a

presença de dois pares de cromossomos meta-submetacêntricos na constituição genética dessa espécie. Essa peculiaridade cromossômica sugere implicações potenciais para a biologia e evolução de *Xestotrachelus robustus*, sublinhando a importância da compreensão detalhada de sua genética para insights mais profundos sobre sua biologia e conservação (Souza, 2003).

Outro caso intrigante é observado em *C*. *nuptialis*, onde estudos revelaram que seis dos seus cromossomos exibem irregularidades meióticas, indicando possíveis problemas relacionados à aderência cromossômica (Loreto, 2005). Um par específico, denominado como L2, manifestou atraso anafásico e a formação de pontes atípicas resultantes da união das cromátides homólogas, localizadas terminalmente. Nessa região, foi identificado um bloco de heterocromatina constitutiva (HC) próximo ao ponto de aderência. Além disso, em algumas células, observou-se um comportamento peculiar do par tardio, sugerindo a possibilidade de que ele não tenha sido incorporado ao novo núcleo formado. Adicionalmente, a presença de fragmentos cromossômicos em algumas células sugere a origem desses fragmentos a partir da separação de células telófásicas. Essas anormalidades meióticas e as características específicas do par L2 destacam a complexidade do processo de divisão celular em *C*. *nuptialis*, evidenciando potenciais implicações para a estabilidade genética e a viabilidade reprodutiva da espécie (Loreto, 2005).

TABELA 1: Número cromossômico, mecanismo de determinação do sexo e morfologia cromossômica em gafanhotos representantes da família Romaleidae

Espécie	No. cromossômico (macho)	No. cromossômico (fêmea)	Sistema sexual	Referências
Alcamenes clarazianus	23	24	XO, XX	1
Antandrus viridis	23	24	XO, XX	1
Brasilacris gigas	23	24	XO, XX	2
Chariacris miniacea	23	24	XO, XX	1
Chromacris miles	23	24	XO, XX	1
C. speciosa	23	24	XO, XX	1
C. nuptialis	23	24	XO, XX	3

C. peruviana	23	24	XO, XX	1
Coryacris angustipennis	23	24	XO, XX	1
Diponthus prope communis	23	24	XO, XX	1
D. clarazianus	23	24	XO, XX	1
D. communis	22	22	XY, XX	1
D. dispar	21	22	XO, XX	1
D. electus	21	22	XO, XX	1
D. maculiferus	21	22	XO, XX	1
Diponthus sp.	23	24	XO, XX	1
Elaeochlora basalis	23	24	XO, XX	1
E. brachyptera	23	24	XO, XX	1
E. trilineata	23	24	XO, XX	1
E. viridicata	23	24	XO, XX	1
E. (? viridicata ?)	23	24	XO, XX	1
Elaeochlora sp.	23	24	XO, XX	1
Tropidacris collaris	23	24	XO, XX	1
Tropidacris cristata grandis	23	24	XO, XX	7
Phaeoparia megacephala	23	24	XO, XX	4
Prionolopha serrata	23	24	XO, XX	1
Procolpia minor	23	24	XO, XX	1
Radacridium nordestinum	23	24	XO, XX	5
R. mariajoseae	23	24	XO, XX	5
Securigera acutangula	23	24	XO, XX	1
Xestotrachelus robustus	23	24	XO, XX	1
Xyleus angulatus	23	24	XO, XX	6
Xestotrachelus robustus	23	24	XO, XX	1
Xyleus attenuatus	23	24	XO, XX	1
X. discoideus	23	24	XO, XX	1
X. (?) gracilis	23	24	XO, XX	1
X. insignis	23	24	XO, XX	1
X. laevipes	22	22	XY, XX	1
X. modestus	23	24	XO, XX	1
Xyleus sp. N° 1	23	24	XO, XX	1
Xyleus sp. N° 2	23	24	XO, XX	1
Xyleus sp. N° 3	23	24	XO, XX	1
Zoniopoda hempeli	23	24	XO, XX	1
Z. iheringi	22	22	XY, XX	1
Z. juncorum	23	24	XO, XX	1
Z. omnicolor	23	24	XO, XX	1
Z. similis	23	24	XO, XX	1
Z. tarsata	23	24	XO, XX	1
Zoniopoda n. sp. N° 1	23	24	XO, XX	1
Zoniopoda n. sp. N° 2	23	24	XO, XX	1

Abila bolivari G. Tos	23	24	XO, XX	1
Phaeoparia n. sp	-	-	-	1

Referencias: Mesa, 1982 (1); Souza e Kido, 1995 (2); Marcos *et al*, 2013 (3); Pereira e Souza 2000 (4); Rocha *et al*, 1997 (5); Souza e Silva-Filha 1993 (6); Thunberg, 1824 (7).

2.4 ANÁLISE DA HC COM FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS NA FAMÍLIA ROMALEIDAE

A heterocromatina é um componente dos cromossomos eucarióticos que desempenha um papel fundamental na organização e regulação do genoma. Ela se refere a regiões de cromatina que possuem propriedades estruturais e funcionais distintas em comparação com a chamada eucromatina. As características marcantes da heterocromatina nos cromossomos eucarióticos alimentaram especulações sobre sua natureza ao longo do tempo (Hennig, 1999).

Historicamente, a heterocromatina foi associada a termos como "lixo" devido à presença de DNA não codificante e repetitivo, como DNAs satélites e elementos transponíveis. No entanto, estudos mais recentes destacam a importância funcional da heterocromatina (Pontecorvo, 1944). Por exemplo, a presença de cópias mestras de transposons HeT na heterocromatina do cromossomo X em *Drosophila* sugere uma função biológica na manutenção telomérica.

A heterocromatina desempenha várias funções essenciais no genoma eucariótico. Ela contribui para a estabilidade genômica, restringindo a atividade de elementos móveis, isolando o reparo do DNA em regiões repetitivas e garantindo a segregação cromossômica precisa. Além disso, a heterocromatina apresenta modificações pós-tradicionais nas histonas, influenciando a regulação do desenvolvimento e restringindo a expressão gênica específica (Hennig, 1999).

Os mecanismos de estabelecimento e manutenção da heterocromatina envolvem fatores específicos de sequência ligados à transcritos, que recrutam enzimas modificadoras da cromatina. A heterocromatina pode se espalhar ao longo da cromatina a partir de locais de nucleação, e sua propensão à disseminação e herança é equilibrada por fatores inibitórios (Allshire, 2017).

Na citogenética clássica, a heterocromatina era detectada por meio do bandeamento C (Sumner, 1972), uma técnica de coloração que utiliza Giemsa para destacar áreas ricas em heterocromatina constitutiva. Essa abordagem permite a distinção de cromossomos, pois eles exibem padrões de bandeamento distintos. Em estudos citogenéticos em gafanhotos da família Romaleidae observou-se que a heterocromatina constitutiva (HC) detectada pelo bandeamento C apresentou intensa variabilidade de tamanho e localização de blocos quando as espécies foram comparadas (Tabela 4). De forma geral, existe uma predominância de HC na região pericentromérica. Contudo, blocos intersticiais e distais são muito frequentes. Uma exceção foi *Radacridium mariajoseae* que apresentou poucos blocos de HC (Rocha *et al*., 1997).

A técnica de análise de heterocromatina (HC) utilizando fluorocromos específicos, como CMA (Chromomycin A3) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), é amplamente empregada na citogenética para investigar a organização e distribuição de regiões ricas em guanina-citosina (GC) e adenina-timina (AT) nos cromossomos. Esta abordagem permite a marcação seletiva de regiões específicas dos cromossomos, com o CMA preferencialmente se ligando a regiões ricas em GC, enquanto o DAPI é um corante de DNA que se liga às regiões cromossômicas ricas em AT. Essa técnica possibilita a identificação de variações na quantidade e na distribuição de heterocromatina em cromossomos, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura genômica. É frequentemente empregada em estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos para compreender melhor a organização do material genético nos níveis moleculares e cromossômicos (Schweizer, 1976, 1981). O brilho do fluorocromo é normalmente uma função da composição do DNA, modificado pela interação com a estrutura do cromossomo (Schweizer, 1981).

A análise da HC, empregando fluorocromos bases específicos (CMA e DAPI), foi aplicada até o momento em 10 espécies de Romaleídeos (Tabela 2). Nesse contexto, observou-se que, na família Romaleidae, essas regiões são predominantemente ricas em GC, evidenciado pela positividade para CMA+.

De acordo com estudos anteriores sobre *Radacridium nordestinum, Phaeoparia megacephala e Xestotrachelus robustus* (Rocha *et al*., 1997; Anjos *et al*., 2013;

Pereira e Souza, 2000; Souza *et al*., 2003), a análise global de HC com fluorocromos revelou uma correlação entre o tamanho do bloco de HC e o de CMA. Outras espécies, como *Chromacris speciosa, Chromacris nuptialis, Radacridium mariajoseae, Tropidacris collaris e Tropidacris cristata grandis* (Souza e Kido, 1995; Loreto *et al*, 2005; Rocha *et al*., 1997; Anjos *et al*., 2013; Rocha *et al*., 2015), exibem grandes blocos de regiões CMA positivas.

Em *Xyleus d. angulatus*, foram identificados grandes blocos de regiões ricas em CMA distribuídos em vários cromossomos do cariótipo nas regiões pericentroméricas e distal, com uma notável ausência de regiões DAPI positivas (Souza, *et al*., 1998; Souza e Silva-Filha, 1993).

Uma condição única, observada até o momento, ocorre em *Zoniopoda tarsata*, que apresenta grandes blocos de regiões DAPI positivas e nenhuma região CMA positiva, sendo a única espécie com predominância de regiões ricas em AT (Vilardi, 1986).

(TABELA 2) Padrão da HC com fluorocromos base-específicos na família Romaleidae. "*" Homogêneo nos cromossomos; "-" não foi encontrada essa informação na literatura; "x" não possui pares de cromossomos com essa característica; "T" todos os cromossomos; "G" cromossomo grande; "M" cromossomo médio; "P" cromossomo pequeno

Espécie	**CMA_3**	**DAPI**	Referências
Zoniopoda tarsata	**-**	$G_1G_2G_3$ **X**	1;2
Xyleus d. angulatus	T	*	3;4
Chromacris speciosa	M_6G_2	*	5
Chromacris nuptialis	M_6	*	11
R. mariajoseae	M_5; X	*	6;7
R. nordestinum	T	*	6;7
Phaeoparia megacephala	T	X	8

Xestotrachelus robustus	T	-	9
Tropidacris collaris	$M_4P_{10}P_{11}$	*	10
Tropidacris cristata grandis	G_1G_2	*	10

Referências: 1-Vilardi(1986b), 2-Paradeda Maria Gracia, Alba Bentos & Alvaro Novello (2008), 3- M.J. Souza, *et al*. (1998), 4 -Souza e Silva-Filha (1993), 5-Souza e Kido (1995), 6 Rocha et al. (1997),7- Anjos *et al* (2013),8-Pereira e Souza (2000), 9- Souza *et al.* (2003),10- Rocha et al (2015), 11 – Loreto *et al* (2005).

2.5 GENES RIBOSSOMAIS: DNAr 18S E 5S

Os DNAs ribossomais (rDNA) constituem sequências repetitivas organizadas em tandem nos genomas eucariotos, desempenhando um papel crucial na síntese do RNA ribossômico (rRNA). Essas sequências, classificadas como porções heterocromáticas, estão associadas às famílias de DNAs repetitivos, caracterizadas por sua repetição em milhares de cópias no genoma (Grifflths *et al*., 2006). A diversidade de funções biológicas dessas sequências é notável, dividindo-se entre codificadoras, com funções bem definidas, e não codificadoras, cujas sequências podem estar dispersas no genoma ou se repetir em tandem.

Os genes ribossômicos, essenciais para a síntese de rRNA, estão agrupados em duas famílias multigênicas principais: o rDNA 45S e a família do rDNA 5S. O rDNA 45S codifica os rRNAs 18S, 5.8S e 26S/28S, enquanto a família do rDNA 5S codifica o rRNA 5S (Martins e Galetti, 2001). A organização do rDNA 45S frequentemente está associada às regiões organizadoras de nucléolos (RONs), detectáveis por impregnação com íon prata quando ativas (Howell, 1980).

A estrutura dos genes ribossomais é altamente conservada em todos os eucariotos, organizando-se em clusters repetidos em tandem. A classe maior do rRNA, composta pelos genes 18S, 5.8S e 28S, é separada por espaçadores não-transcritos (NTS), além dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2). Esses espaçadores

desempenham um papel crucial na organização das unidades repetidas, contribuindo para a regulação precisa da transcrição e processamento pós-transcricional desses genes (Sumner, 2003; Raska *et al*., 2004).

A transcrição dos genes ribossomais ocorre a partir de uma unidade precursora conhecida como 45S, que, por meio de eventos pós-transcricionais, origina as moléculas maduras de rRNA (Weider *et al*., 2005). Esses genes ribossomais, agrupados em sítios cromossômicos, geralmente correspondem às regiões organizadoras de nucléolos, desempenhando um papel fundamental na formação do nucléolo e na síntese de ribossomos.

A classe menor do rRNA, composta pelo gene 5S, pode ser encontrada em diferentes áreas dentro do genoma. Em eucariotos inferiores, esses genes podem estar interesparsados com outros genes multicópias, incluindo o rDNA 45S. Nos eucariotos superiores, como observado em gafanhotos da região Neotropical, os genes 5S e 45S frequentemente ocupam diferentes regiões do genoma, embora co-localizações em um mesmo cromossomo também possam ocorrer (Drouim e Monez, 1995; Sumner, 2003).

A técnica de impregnação com nitrato de prata (AgNO3) tem sido tradicionalmente utilizada para identificar a localização das RONs ativas, embora apresente limitações ao identificar apenas as RONs previamente ativas na transcrição do rRNA. Em contraste, a técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH), combinada com a impregnação AgNO3, oferece uma abordagem mais precisa para estudar a atividade e a localização das sequências ribossomais 45S (Sumner, 2003).

Os estudos sobre gafanhotos na região Neotropical desempenharam um papel fundamental na compreensão das regiões organizadoras de nucléolos. Técnicas avançadas, como a Hibridização in situ fluorescente (FISH) e a impregnação com AgNO3, têm sido amplamente utilizadas para caracterizar os marcadores cromossômicos, especialmente o DNA ribossomal (rDNA) 45S, em diversas espécies. Essas abordagens permitiram uma identificação precisa de variações na localização e número de sítios de DNAr 45S em diferentes espécies de gafanhotos (Moura *et al*., 1996; Cabral *et al*., 2011).

Os estudos de mapeamento em gafanhotos, utilizando FISH, têm se concentrado principalmente em famílias como Acrididae, Romaleidae, Proscopiidae e Ommexechidae. As análises abrangeram um amplo espectro de espécies, incluindo 69 da família Acrididae, 9 de Romaleidae, quatro de Proscopiidae e duas de Ommexechidae, utilizando sondas de rDNA 45S (Cabrero e Camacho, 2008; Oliveira *et al*., 2011; Bueno *et al*., 2013; Silva-Neto *et al*., 2015; Carvalho *et al*., 2011). Além disso, foram mapeados sítios de rDNA 5S em cerca de 48 espécies de Acrididae, seis de Romaleidae, quatro de Proscopiidae e uma de Ommexechidae, fornecendo insights sobre variações na quantidade e localização desses sítios (Loreto *et al*., 2008; Cabral *et al*., 2011a; Oliveira *et al*., 2011; Bueno *et al*., 2013; Neto *et al*., 2015; Souza *et al*., 2015).

A marcante variabilidade na quantidade e localização dos sítios cromossômicos foi observada em gafanhotos das famílias Acrididae, Romaleidae e Proscopiidae. Essa variação inclui a presença de um a oito pares cromossômicos com sítios de rDNA 45S, localizados em autossomos e/ou no cromossomo X. Além disso, foi constatada a presença dessas sequências em cromossomos B (Cabrero e Camacho, 2008; Cabral *et al*., 2011).

Na família Romaleidae, a análise da distribuição das RONs também foi realizada em representantes de gafanhotos. Estudos em *Xestotrachelus robustus*, *Chromacris nuptialis* e *C*. *speciosa* revelaram variações na localização dos sítios de DNAr 45S, sugerindo a influência de eventos como inversões paracêntricas, amplificações de heterocromatina ou crossing-over desigual na modificação da posição desses sítios ao longo da evolução (Souza *et al*., 2003; Loreto *et al*., 2005).

A variabilidade na distribuição dos genes ribossomais, tanto entre espécies quanto intraespecificamente, pode ser atribuída a diferentes mecanismos, incluindo rearranjos cromossômicos, recombinação ectópica e transposição de repeats para novas regiões cromossômicas. Estudos recentes, como o de Cabrero e Camacho (2008), analisaram a expressão e localização cromossômica do DNAr 45S em várias espécies de gafanhotos, identificando padrões consensuais em subfamílias específicas.

2.6 GENES HISTONA

Os genes histona desempenham um papel crucial na organização do DNA e na compactação genômica, sendo fundamentais para a formação dos nucleossomos, que constituem a estrutura básica do empacotamento do material genético. Estas pequenas proteínas, presentes em todos os organismos eucarióticos, podem ser divididas em dois grupos principais: as histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4), que interagem com o DNA para formar os nucleossomos, e a histona ligadora (H1), responsável por unir nucleossomos adjacentes, conferindo uma organização tridimensional ao genoma (Sumner, 2003).

Além de sua função estrutural, as histonas desempenham papel no controle da regulação gênica, influenciando diversos processos celulares e a expressão genética. A organização genética das histonas varia entre diferentes grupos de organismos, com invertebrados apresentando clusters de genes histona compactos e frequentemente dispostos em arranjo tandem, enquanto vertebrados exibem uma organização mais espaçada ao longo do genoma, indicando divergências na evolução cromossômica (Thatcher e Gorovsky, 1994).

A conservação evolutiva das sequências gênicas, especialmente nas histonas H3 e H4, torna-as marcadores valiosos para investigações sobre a evolução cromossômica (Zhang *et al*., 2007). As proteínas H3 e H4, consideradas altamente conservadas evolutivamente, exibem sequências de aminoácidos praticamente idênticas em distintas espécies, reforçando sua utilidade como marcadores cromossômicos ideais.

A localização precisa dos genes histona nos cromossomos é importante na compreensão da evolução das espécies, sendo técnicas como a hibridização in situ por fluorescência (FISH) utilizadas para revelar a posição exata desses genes. Estudos em humanos, roedores e invertebrados marinhos forneceram informações valiosas sobre a distribuição espacial desses genes (Kimura, 2013; Deussing, 2017). Pesquisas em moluscos bivalves, destacaram a preferência pela localização telomérica de genes de histonas, indicando uma possível associação entre a

organização genômica e a estrutura cromossômica desses organismos (Šatović vukšić, 2021).

Em gafanhotos, a comparação das localizações dos genes de histona H3/H4 em Acrididae e Proscopiidae revela padrões intrigantes na organização genômica desses grupos de gafanhotos. Em Acrididae, a pesquisa conduzida por Cabrero et al. (2009) destaca uma notável conservação na localização cromossômica do gene de histona H3. Em espécies com 2n=23, X0, o sítio é consistentemente encontrado na região intersticial do cromossomo 8. Por outro lado, em espécies com 2n=17, X0, resultado de fusões cêntricas, a localização da histona H3 varia, sendo observada no cromossomo 3 de diferentes gêneros de Gomphocerinae.

No contexto Neotropical, a análise de quatro espécies de Proscopiidae (*Tetanorhynchus silvai, Scleratoscopia protopeirae, Scleratoscopia spinosa e Stiphra robusta* (Cabral, 2011) mostra uma distribuição específica da histona H3. Todas as espécies compartilham um único sítio, co-localizado com o gene 5S no cromossomo 4. No entanto, *T*. *silvai* se destaca ao exibir sítios mais distantes do centrômero, enquanto nas outras espécies a localização permanece pericentromérica. A interpretação desses dados sugere que a associação entre a histona H3 e o RNAr 5S pode representar uma condição ancestral entre os artrópodes em geral, com relevância especial para os Proscopiidae, um grupo de gafanhotos antigo. Esse padrão de localização dos genes de histona ressalta a importância dessas moléculas na estruturação e estabilidade do genoma ao longo da evolução dos gafanhotos.

No caso de Romaleidae, a dispersão da histona H3 em diferentes pares cromossômicos em várias espécies (Neto *et al*, 2013; Machado *et al*, 2014 e Rocha *et al*, 2015), destaca uma maior variabilidade na organização genômica dentro desta família de gafanhotos.

2.7 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH) EM GAFANHOTOS DA FAMÍLIA ROMALEIDAE.

A hibridização in situ fluorescente (FISH) representa um marco significativo na investigação da localização precisa de sequências de ácidos nucléicos (DNA e RNA) em organismos eucarióticos, abrangendo diversas estruturas como citoplasma,

organelas, cromossomos e núcleo. A metodologia teve suas raízes estabelecidas por Gall e Pardue em 1969, quando, por meio do uso pioneiro de sondas de RNA radiomarcadas, conseguiram mapear com precisão sequências específicas de DNA no anfíbio *Xenopus laevis*. Inicialmente, as hibridizações in situ utilizavam sondas marcadas com radioisótopos, mas desvantagens como a instabilidade dessas moléculas, resolução limitada e os riscos associados à radioatividade impulsionaram avanços. Levsky e Singer, em 2003, destacaram a necessidade de métodos mais seguros e vantajosos, catalisando o desenvolvimento contínuo da técnica. Dessa forma, a hibridização in situ evoluiu ao longo do tempo, permitindo o mapeamento de sequências de DNA satélite e genes de cópia única, consolidando-se como uma ferramenta crucial na investigação molecular (Gall e Pardue, 1969; Levsky e Singer, 2003). A FISH, baseada em sondas marcadas por fluorocromos, permite a localização da molécula-alvo hibridizada com a sonda através de um microscópio equipado com luz ultravioleta e filtros adequados (Safer *et al*., 1982). Dois métodos de marcação são empregados na FISH: a marcação direta, na qual nucleotídeos da sonda são ligados diretamente a fluorocromos, e a marcação indireta, na qual os nucleotídeos são acoplados a uma molécula marcadora, como biotina e digoxigenina, que são detectadas por anticorpos conjugados a fluorocromos (Schwarzacher e Harrison, 2001). A escolha da sonda é crítica na FISH, podendo ser sequências teloméricas, centroméricas, genes ribossomais 45S e 5S, DNA altamente repetitivo, genes de cópia única, segmentos cromossômicos, braços cromossômicos ou até mesmo o genoma total (Schwarzacher, 2003). A FISH tem uma ampla gama de aplicações, incluindo a interpretação de rearranjos cromossômicos, identificação de segmentos ou cromossomos homólogos e homólogos, mapeamento gênico, determinação de grupos de ligação, além de fornecer subsídios para o entendimento da estrutura, função, evolução e organização molecular da cromatina e dos cromossomos (Trask, 1991; Schwarzarcher e Harrison, 2000; Levsky e Singer, 2003). Na citogenética, a FISH destaca-se na melhoria da caracterização do cariótipo, permitindo a detecção de marcadores citológicos por meio da localização cromossômica de sequências de DNA em diversas espécies (López *et al*., 1999; Cabrero *et al*., 2003a; Abdelaziz et al., 2007). A técnica tornou-se essencial na construção de mapas físicos de cromossomos, análise de estruturas e rearranjos cromossômicos, bem como no estudo abrangente da estrutura, função e evolução de cromossomos e genomas (Neto

et al., 2013). Entre as principais sequências estudadas, particularmente em gafanhotos, destacam-se as famílias multigênicas de DNA ribossomal e histona (López *et al*., 1999; Cabrero *et al*., 2003; Abdelaziz *et al*., 2007).

A técnica de FISH vem sendo utilizada em uma gama de estudos, visando a localização cromossômica das mais variadas sequências de DNA. Nos gafanhotos da família Romaleidae a técnica de FISH é amplamente utilizada para visualização de sequências repetitivas, como as das famílias multigênicas DNA ribossomal e Histona (Neto et al., 2013). Atualmente 9 espécies de gafanhotos da família Romaleidae tiveram seus cromossomos mapeados pela técnica de FISH. As sondas mais utilizadas nesses estudos são as de DNA ribossômico 18s e 5s, e as sondas de DNA de histonas, sendo elas, as sondas H3 e H4 (Tabela 3). Em relação às sondas de DNA ribossomal (rDNA), elas desempenharam um papel crucial nos estudos envolvendo gafanhotos Romaleideos. Os resultados revelaram que as espécies analisadas possuem de um a três sítios dessa sequência, destacando uma notável diversidade em termos de localização. Cinco espécies apresentam exclusivamente um sítio para o rDNA 18s. *Chromacris speciosa e Chromacris nuptialis* possuem o 18s no cromossomo M6 (Anjos *et al*., 2013*), Brasilacris gigas* no cromossomo M9, *Xestotrachelus robustus* no cromossomo M5 (Neto *et al.,* 2013) e *Radacridium mariajoseae* no cromossomo X (Anjos *et al*., 2013). Duas espécies possuem dois sítios para o 18s*: Tropidacris collaris* nos cromossomos pequenos P10 e P11 e *Tropidacris cristata grandis* nos cromossomos M5 e M6 (Rocha et al., 2015). Outras duas espécies apresentam 3 sítios*: Xyleus d. angulatus* nos cromossomos G3, M4 e X (Machado et al., 2011; Souza, 1998) e Radacridium nordestinum nos cromossomos G2, P9, P10 (Anjos et al., 2013). No que diz respeito ao DNA ribossomal 5s, foram estudadas apenas seis espécies, evidenciando variações na quantidade e localização dos sítios de forma semelhante ao rDNA 18s. Duas espécies apresentam apenas um sítio para o 5s*: Chromacris nuptialis*, com a sequência marcada no cromossomo M7 e *Brasilacris gigas* no cromossomo G4 (Neto *et al.,* 2013). Duas espécies possuem dois sítios para o 5s, sendo *Chromacris speciosa* e *Xestotrachelus robustus*, com sítios 5s nos cromossomos M4 e M7 (Neto *et al*., 2013). Uma espécie apresenta três sítios para o 5s: Radacridium mariajoseae, com marcações nos cromossomos G1, G2 e X, e apenas uma espécie exibe quatro marcações, com *Radacridium nordestinum* apresentando marcações nos cromossomos G2, G3, M4 e M5 (Anjos et al., 2013). As

sondas de genes de histona produziram resultados semelhantes aos do rDNA em termos de número e variedade de localização dos sítios. Em relação às sondas H3/H4, que por estarem localizadas no mesmo sitio são descritas como uma única sequência, nove espécies foram estudadas, com a sequência para H3/H4 encontrada nos cromossomos M5 em *Radacridium mariajoseae* e *Radacridium nordestinum*, G2 em *Chromacris speciosa, Chromacris nuptialis* e *Xestotrachelus robustus* (Neto *et al*., 2013; Rocha *et al*., 2015), no cromossomo M9 em Brasilacris gigas (Neto et al., 2013), nos cromossomos G2, M4 e X em *Xyleus d. angulatus* (Machado *et al*., 2011) e nos cromossomos M6, P10, P11 em *Tropidacris collaris* (Anjos *et al*., 2013). *Tropidacris cristata grandis* apresentou um caso interessante, pois as sondas do gene da histona H3 hibridaram nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, exceto em dois pares de tamanho médio e em dois pares pequenos (G1, G2, M3, M4, M5, M6, M7, X) (Anjos et al, 2013).

(TABELA 3) Padrão de genes ribossomais e histonas por hibridização *in Situ* (FISH) na família Romaleidae. "*" Homogêneo nos cromossomos; "-" não foi encontrada essa informação na literatura; "x" não possui pares de cromossomos com essa característica; "T" todos os cromossomos; "G" cromossomo grande; "M" cromossomo médio; "P" cromossomo pequeno

Espécies	18S	5S	H3/H4	Referências
Xyleus d. angulatus	G3, M4, X	-	G2, M4, X	1,2
Chromacris speciosa	M6	M4, M7	G2	3, 4, 5
Chromacris nuptialis	M6	M7	G2	5
Radacridium mariajoseae	X	G1, G2, X, M5	M5	6
Radacridium nordestinum	G2, P9, P10	G2, G3, M4, M5	M5	6
Xestotrachelus robustus	M5	M4, M7	G2	5
Tropidacris collaris	P10, P11	-	M6, P10, P11	7
Tropidacris cristata grandis	M5, M6	-	G1, G2, M3, M4, M5, M6 M7, X	7
Brasilacris gigas	M9	G4	M9	5

Referências: 1 - Machado *et al*, 2011; 2- Souza, 1997, 3-Souza e Kido, 1995, 4- Loreto *et al*, 2005, 5 - Neto *et al*, 2013; 6 - Anjos *et al*, 2013, 7 - Rocha *et al*, 2015.

3. OBJETIVO

3.1 **OBJETIVO GERAL**

Identificar e analisar de forma comparativa o número e a distribuição de sítios de DNA genes ribossomais 45S e de Histonas H3 nos cariótipos de espécies de gafanhotos pertencentes à família Romaleidae.

3.2 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar o número e a localização dos sítios de DNAr e Histona H3 em cada espécie por meio de FISH;
- Analisar comparativamente os resultados, somados aos da literatura, a fim de propor um entendimento sobre a organização e os mecanismos evolutivos que atuam nessas sequências repetitivas de DNA nesta família.

4. CAPÍTULO I:

Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e histona H3 em gafanhotos da família Romaleidae.

O manuscrito a seguir será submetido à revista Genetics and Molecular Biology, publicada no Brasil

Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e de histona em gafanhotos da família Romaleidae.

NASCIMENTO, J. D. P.[1]; LORETO, V.[1]; NASCIMENTO, T.[2],

[1] Departamento de Genética, Centro de Biociências/CB, Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE.Recife, Pernambuco, Brasil

[2] Departamento de Botânica, Centro de Biociências//CB, Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE.Recife, Pernambuco, Brasil | Max Planck Institute for Plant Breeding Research (Colônia/Alemanha)

PALAVRAS-CHAVE: FISH, Heterocromatina, Citogenética, Gafanhoto

RESUMO

A família Romaleidae, composta por ~437 espécies, é predominantemente encontrada em regiões neotropicais. A maioria dessas espécies compartilha um número conservado de cromossomos [*2n* = 23 em machos (X0) e *2n* = 24 em fêmeas (XX)]. Este estudo teve como objetivo a identificação e comparação do número e da distribuição dos *loci* de DNAr 45S e histona H3 nos cariótipos de quatro espécies dos gêneros *Agriacris*, *Prionolopha*, *Epiprora* e *Phaeoparia* (Romaleidae), utilizando hibridização in situ fluorescente com sondas específicas. As espécies analisadas exibiram um cariótipo conservado em número, típico de Romaleidae. A coloração diferencial CMA/DAPI revelou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) ricos em GC (CMA^+) nas regiões pericentroméricas de pares cromossômicos específicos em todas as espécies. Após a FISH, os *loci* de DNAr 45S foram identificados nas regiões pericentroméricas dos pares cromossômicos S10 em *Agriacris auripennis*, M7 em *Prionolopha serrata* e *Epiprora hilaris*, e M6 em *Phaeoparia megacephala*. A sonda H3 foi mapeada nas regiões pericentroméricas do cromossomo S9 de *Agriacris auripennis*, M9 de *Prionolopha serrata* e *Phaeoparia megacephala*, e M7 de *Epiprora hilaris*. Os resultados sugerem uma similaridade no número de loci de DNAr 45S e sítios de H3, mas apontam para diferenças em suas localizações, sugerindo a ocorrência de rearranjos cromossômicos e apontando para variação na evolução cromossômica do grupo.

INTRODUÇÃO

A família Romaleidae possui mais de 437 espécies, distribuídas em 80 gêneros e 3 subfamílias: Romaleini, Aucacrinae e Trybliophorinae. Sua distribuição é restrita para a região Neotropical, com representantes da Argentina ao México (Carbonell, 1977, Braga *et al.*, 2015). O Brasil possui cerca de 168 representantes de gafanhotos desta família, com os mesmos podendo ser encontrados em todas as regiões do país, principalmente no Norte e Nordeste. No nordeste do Brasil, mais de 15 espécies foram relatadas, entre elas destaca-se o gênero *Radacridium*, a espécie *Xyleus discoideus angulatus* e o gênero *Brasilacris*, que é monotípico e encontrado exclusivamente nesta região (Carbonell, 2003; Souza e Kido, 1995). Assim, a família Romaleidae consiste em gafanhotos de diferentes cores e variados tamanhos, que podem ser alados, braquípteros e macrópteros. Alguns de seus representantes são descritos como os maiores gafanhotos na natureza em termos de tamanho, corpo e biomassa (Triplehor e Johnson, 2011).

Romaleidae tem em sua maioria espécies com cariótipo conservado apresentando *2n* = 23, X0 em machos e *2n* = 24, XX em fêmeas, com a maioria dos cromossomos sendo acrocêntricos (Mesa *et al*., 1982). No entanto, algumas espécies dos gêneros *Xyleus* e *Zoniopoda* (Mesa *et al*., 1982) mostram variações nesse número em decorrência de polimorfismo para cromossomo B e em *Xestotrachelus robustus* cromossomos com morfologias diferentes foram observados: os pares P9 e P10 são meta- submetacêntricos (Souza *et al*., 2003).

O genoma dos Romaleídeos, como de outros eucariotas possui grande abundância de DNA repetitivo, sendo estes satélites, minissatélites e microssatélites, e DNA repetitivo disperso no genoma, como transposons e retrotransposons (Martíns, 2004). A família multigênica de RNA ribossomal, é constituída de sequências de DNA repetidas em tandem, formando as regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Essa família multigenicas ainda tem o DNAr 5S, este não é transcrito pela mesma RNA polimerase que os outros genes de DNAr (Drouin e Sá, 1995; Barzotti *et al*, 2000). Genes de DNAr tem sido extensivamente estudado em vários grupos de organismos, incluindo gafanhotos. Com o advento da técnica de Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) foi possível detectar sítios adicionais de DNA ribossomal, que não era possível através da impregnação por nitrato de prata. Até o presente momento a técnica de FISH foi utilizada em nove espécies, sendo elas *Xyleus d. angulatus, Chromacris speciosa, Chromacris nuptialis, Radacridium mariajoseae, Radacridium nordestinum, Xestotrachelus*

robustus, Tropidacris collaris, Tropidacris cristata grandis e Brasilacris gigas (Souza *et al*., 1998, 2003; Neto *et al*., 2013).

Os genes que codificam as Histonas são também organizados em sequências repetitivas em tandem (Barzotti *et al*, 2000). Mais recentemente, esses genes têm sido estudados através da técnica de FISH em vários grupos de organismos vertebrados e invertebrados, podendo o gene de histona estar presente em apenas um (bivalve) ou mais de um autossomo (humano) (Albig *et al*., 1996; Zhang *et al*., 2007). Entre os genes desta família, H3 e H4 têm sido extensivamente explorados em estudos citogenéticos que buscam entender sua alta conservação nos gafanhotos e em outros organismos. Trinta e cinco espécies de gafanhotos da família Acrididae já tiveram seus cromossomos mapeados para os genes de histonas H3 e H4, e todos elas possuem os genes em só um par cromossômico (Cabrero *et al*., 2009). Algumas espécies de Romaleidae tiveram o gene H3/H4 mapeados, entre elas podemos citar *Xyleus d. angulatus* (Machado *et al*., 2014), *Brasilacris gigas, Chromacris nuptialis, C. speciosa e Xestotrachelus robustus* (Neto *et al*., 2013).

Apesar de poucos estudos citogenéticos terem sido realizados em representantes da família Romaleidae, algumas análises indicam que este grupo apresenta diversidade cariotípica, em relação ao número cromossômico, como *Diponthus baculíferos, D. electus e D. díspar*, que possuem número diploide igual a 21 X0 e 22 XX (Mesa *et al*., 1982, Neto *et al*, 2013) e variabilidade na composição das sequências repetitivas (Tabela 1). Desta forma, estudos cromossômicos em mais representantes desta família são de grande importância para a compreensão, não só da composição das sequências repetitivas nestes organismos, mas também para o estudo da evolução cromossômica do grupo e sua organização genômica. Nesse sentido o presente estudo busca compreender a evolução cromossômica do grupo, através da identificação e comparação do número e distribuição dos genes ribossomais 45S e Histona H3 no cariótipo de gafanhotos representantes da família Romaleidae.

METODOLOGIA

1.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL

Para o presente trabalho foram utilizados 75 indivíduos machos de quatro espécies de gafanhotos da família Romaleidae. Sendo 21 indivíduos representantes de *Prionolopha serrata* (tribo Romaleini), coletados na cidade de Santa Bárbara (Latitude: 01º 13' 25" S Longitude: 48º

17' 40" W (DMS)), no Pará, entre 2009 e 2010; 24 representantes de *Agriacris auripennis* (tribo Romaleini), coletados em Igarassu (Latitude: 7° 50' 4" S Longitude: 34° 54' 23" W(DMS)), Pernambuco, em 1993; 18 indivíduos representantes de *Epiprora hilaris* (tribo Phaeoparini) coletados em Santa Isabel (Latitude: 1° 17' 58" S Longitude: 48° 9' 40" W(DMS)), no Pará, em 2009 e 12 indivíduos representantes de *Phaeoparia megacephala* (tribo Phaeoparini), coletados em Recife (Dois Irmãos)(Latitude: 29° 34' 56" S Longitude: 51° 5' 40" W(DMS)), Pernambuco, em 1995.

Os gafanhotos foram capturados com a ajuda de uma rede entomológica e colocados em sacolas plásticas apropriadas, nas quais elas foram transportadasas para o laboratório. A identificação taxonômica dos indivíduos foi realizada pelo Prof. Carlos S. Carbonell da Universidade de Montevidéu, Uruguai. Os indivíduos machos foram sacrificados com éter, para a retirada de seus testículos, sendo estes fixados em Carnoy (solução com etanol e ácido acético 3:1). O material foi estocado a -20^{0}C para posterior preparação de lâminas. Após a dissecação, os indivíduos foram colocados na estufa a 37°C por um período de oito dias e, então, guardados na coleção entomológica do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH). Alguns espécimes foram armazenados no freezer para futura extração de DNA. De forma a elucidar a correta identificação dos pares cromossômicos portadores dos sítios de DNAr e Histona H3 foram empregadas as técnicas de coloração convencional e análise com fluorocromos.

1.2. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA COLORAÇÃO CONVENCIONAL

Para a análise convencional, as lâminas foram preparadas com um ou mais folículos testiculares através da técnica clássica de esmagamento. O folículo foi colocado na lâmina, adicionou-se uma gota de ácido acético 60% e posteriormente o material foi corado com orceína lacto-acética a 2%, para observação das células em microscópio de luz.

1.3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA COLORAÇÃO CMA/DAPI.

Para a análise CMA/DAPI e FISH, as lâminas foram preparadas com um ou mais folículos testiculares através da técnica clássica de esmagamento do material entre lâmina e lamínula. O folículo foi colocado na lâmina, adicionou-se uma gota de ácido acético 60% e esmagado. Posteriormente as lâminas foram imergidas em nitrogênio líquido por 5 minutos para retirada das lamínulas e deixadas para secarem em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida foram adicionadas às lâminas 8µl de CMA. As lâminas coradas com CMA foram

mantidas em câmara úmida escura por 1 hora. Em seguida foi retirado a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e adicionado 8 µl de DAPI e meio de montagem. As lâminas foram guardadas ao abrigo da luz por três dias em temperatura ambiente até o momento de análise em microscópio de fluorescência.

1.4. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir do músculo da pata de dois indivíduos de cada espécie. O músculo foi misturado ao tampão de lise, proteinase K e SDS 10%. O material macerado em nitrogênio líquido foi colocado a 65°C por 24 horas. Posteriormente, ocorreu a adição de NaCl 5M. O sobrenadante foi descartado e, então, acrescentado isopropanol. O DNA permaneceu durante uma hora a – 20°C. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet lavado com etanol a 70%. Depois da secagem do DNA, o mesmo foi ressuspendido com TE e estocado a – 20°C. A presença de DNA foi confirmada mediante eletroforese.

1.5. OBTENÇÃO DAS SONDAS PARA FISH

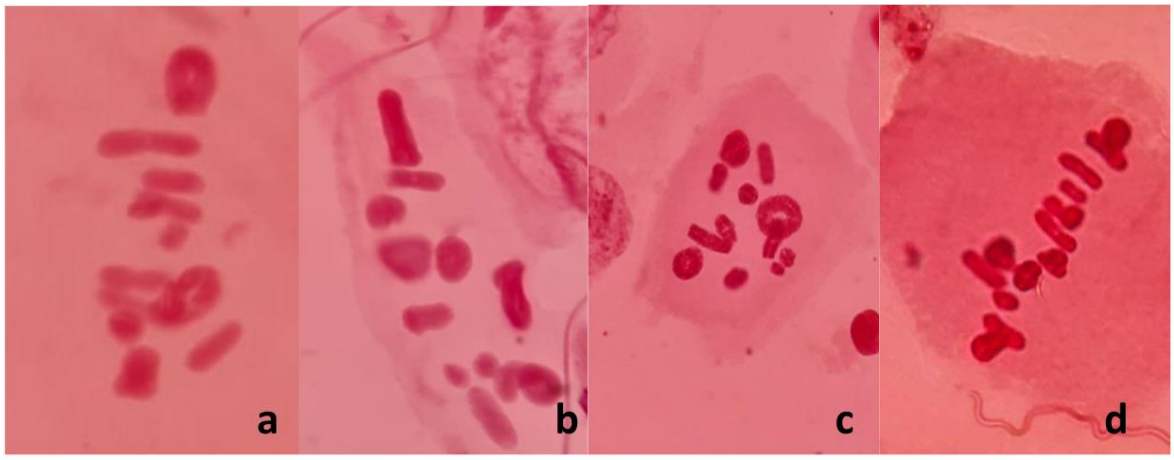
A sonda de DNAr 35S de *Triticum aestivum* (equivalente ao DNAr 45S de insetos) foi obtida a partir do clone Pta71 (Gerlach e Bedbrook, 1979) e marcada diretamente por Nick translation com alexafluor-488 dUTP enquanto que a sonda para o gene da Histona H3, foi obtida por PCR a partir do DNA genômico da espécie usando primers universais para a sequência: F-1 (5'- ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC -3') e R-1 (ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC -3'), e marcada diretamente com Cy3 dUTP também por Nick translation.

1.6. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH).

As lâminas contendo as preparações citológicas, previamente fotografadas com CMA/DAPI de cada indivíduo foram limpas com fixador Carnoy e submetidas a uma série alcoólica. Em seguida foram tratadas com solução de pepsina por 20 min a 37 ºC em câmara úmida pré-aquecida, pós fixadas com paraformaldeído a 4%, desidratadas em série alcoólica: 3 min em etanol 70% e 3 min em etanol 100% e em seguida hibridizadas, utilizando um mix de hibridização composto por Formamida, Dextrano Sulfato, SSC, DNA bloqueador, Sonda e dH2O. A hibridização ocorreu também a 75°C durante 5 min e as lâminas foram deixadas overnight para a renaturação. A documentação fotográfica da FISH foi realizada utilizando sistema de captura de imagens com câmera digital acoplada a microscópio (sistema Leica). As imagens das células capturadas pelo programa CW4000 foram montadas no Adobe Pothoshop.

RESULTADOS

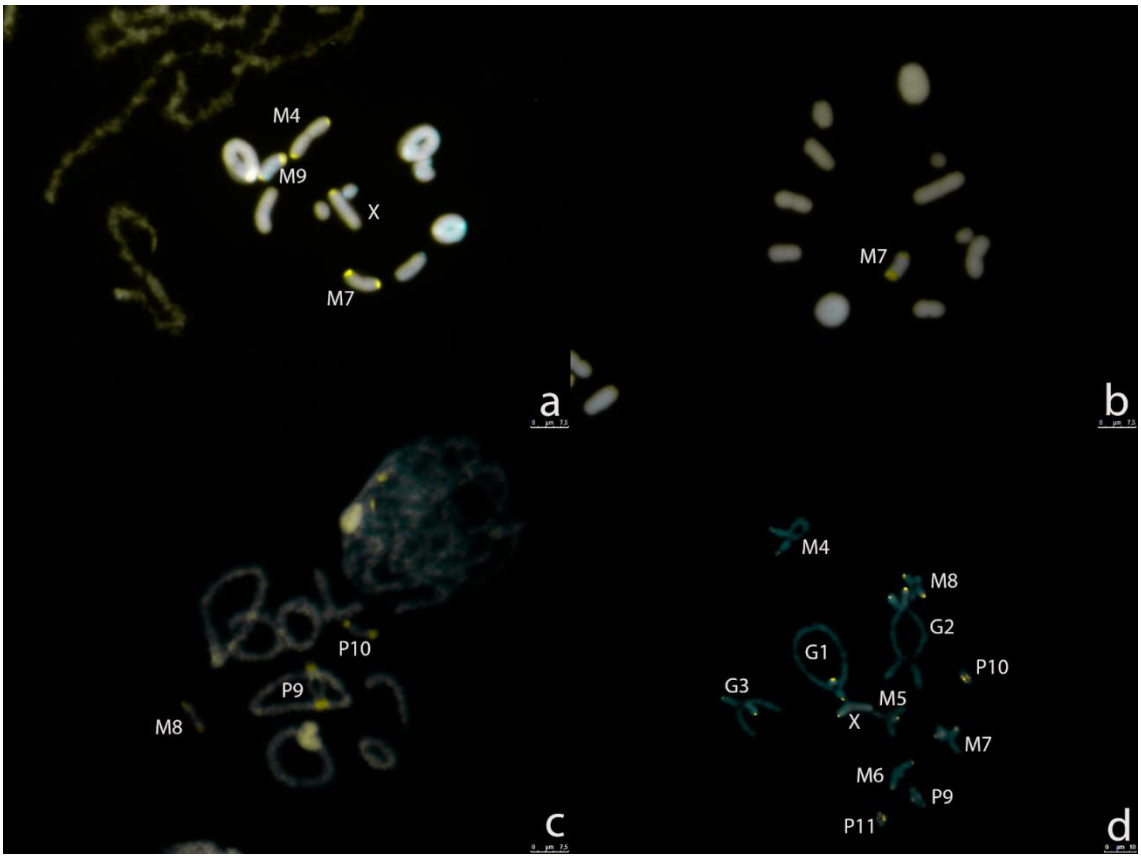
Agriacris auripennis, *Prionolopha serrata*, *Epiprora hilaris* e *Phaeoparia megacephala*,apresentaram cariótipo com *2n* = 23,X0 (macho). Em *Agriacris auripennis* e *Epiprora hilaris* os cromossomos foram acrocêntricos e puderam ser organizados em três pares grandes (G1-G3), cinco médios (M4-M8) e três pares pequenos (P9-P11) (Figura 1a, 1c), Já *Prionolopha serrata* e *Phaeoparia megacephala* possuem autossomos acrocêntricos e puderam ser organizados em três pares grandes (G1-G3), seis médios (M4-M9) e dois pequenos (P10-P11) (Figura 1b, 1d). O cromossomo X nas quatro espécies é de tamanho médio.



(FIGURA 1) Coloração convencional em células meióticas de diferentes espécies de Romaleidae. *Agriacris auripennis* (metáfase I) (a), Prionolopha *serrata* (metáfase I) (b), *Epiprora hilaris (diplóteno)* (c) *e Phaeoparia megacephala* (metáfase I) (d) apresentam cariótipo com 2n= 23,X0 (macho).

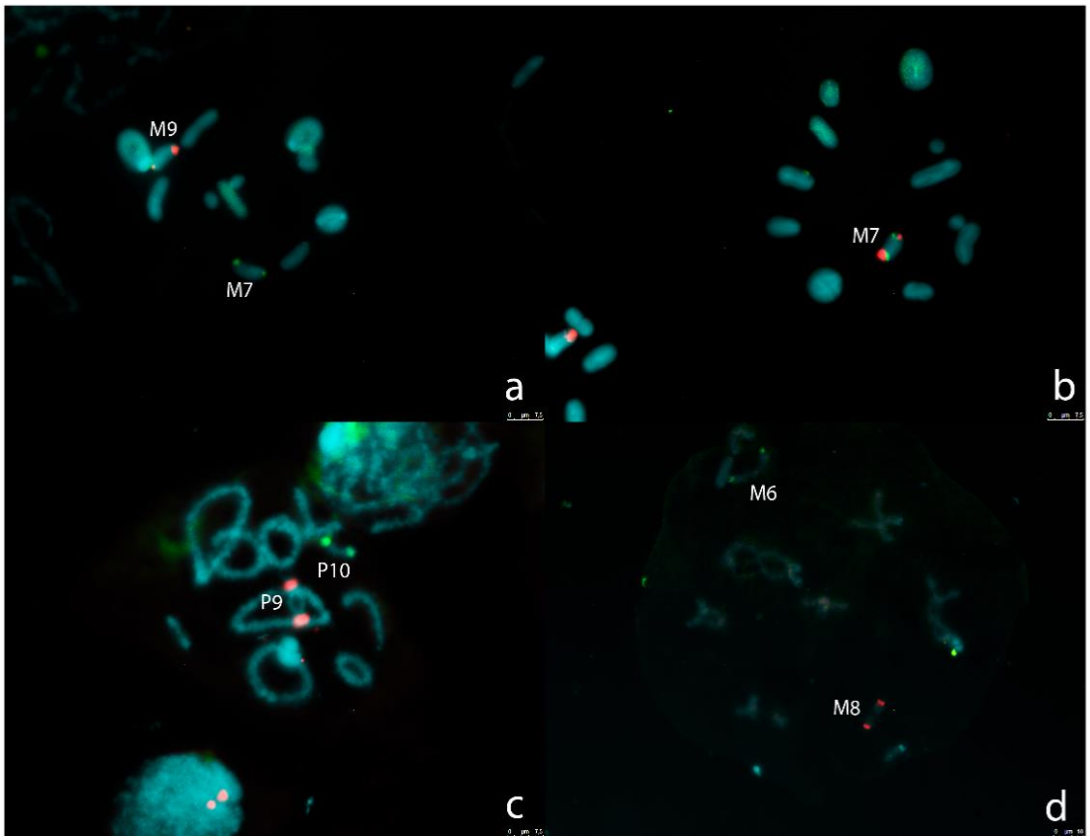
A coloração sequencial CMA/DAPI mostrou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) ricos em GC (CMA^{+}) na região Pericentromérica de 3 pares cromossômicos, sendo um médio (M8) e dois pequenos (P9 e P10) em *Agriacris auripennis* (Figura 2c). *Prionolopha serrata* apresenta 4 pares de cromossomos com regiões CMA positivas, os pares M4, M7 e M9 além do cromossomo X (Figura 2a). *Epiprora hilaris* apresentou apenas uma região CMA positiva, localizada na região Pericentromérica de um cromossomo médio (M7) (Figura 2b). *Phaeoparia megacephala*, apresentou regiões CMA positiva em todos os seus cromossomos, com essas regiões estando localizadas majoritariamente na região Pericentromérica dos cromossomos,

(Figura 2d). Todas as quatro espécies estudadas no presente trabalho não apresentaram regiões DAPI positivas.



(FIGURA 2) Coloração sequencial CMA/ DAPI identificando as regiões CMA3^{+} em *Prionolopha serrata* (Diplóteno) (M4, M7, M9 e X) (a), *Epiprora hilaris* (Metáfase I) (M7) (b), *Agriacris auripennis* (Paquíteno) (M8, P9 e P10) (c) e *Phaeoparia megacephala* (Paquíteno) (Todos) (d).

Após a FISH, a sonda de DNAr 35S marcou um único sítio na região Pericentromérica do cromossomo médio (M7) em *Prionolopha serrata* (Figura 3a) e em *Epiprora hilaris* (Figura 3b), um sítio no cromossomo pequeno (P10) em *Agriacris auripennis* (Figura 3c) e no cromossomo médio (M6) em *Phaeoparia megacephala* (Figura 3d). Por sua vez, a sonda de histona H3 foi mapeada e marcada na região Pericentromérica do cromossomo pequeno (P9) em *Agriacris auripennis* e no cromossomo médio (M9) em *Prionolopha serrata*, em *Epiprora hilaris* marcou na região Pericentromérica do cromossomo médio (M7), já em *Phaeoparia megacephala* marcou na região Pericentromérica do cromossomo médio (M8).



(FIGURA 3) Hibridização *in situ* fluorescente usando sondas DNAr35S (verde) e H3 (vermelho) em *Prionolopha serrata* (Diplóteno) (35s: M7, H3: M9) (a), *Epiprora hilaris* (Metáfase I)(35s: M7, H3: M7) (b), *Agriacris auripennis* (Paquíteno) (35s: P10, H3: P9) (c) e *Phaeoparia megacephala* (Paquíteno) (35s: M6, H3: M8) (d).

DISCUSSÃO

A pesquisa abrangente sobre quatro espécies de gafanhotos Agriacris *auripennis, Prionolopha serrata, Epiprora hilaris e Phaeoparia megacephala*, proporcionou uma compreensão aprofundada da organização cromossômica e distribuição de heterocromatina constitutiva (HC) nestas espécies. Os resultados revelaram um cariótipo consistente em todas as espécies, com 2n = 23, X0, indicando 22 autossomos e um cromossomo sexual X.

A morfologia detalhada dos cromossomos destacou características distintas entre as espécies. *Agriacris auripennis e Epiprora hilaris* exibiram cromossomos acrocêntricos organizados em três pares grandes, cinco médios e três pares pequenos. Por outro lado, *Prionolopha serrata e Phaeoparia megacephala* possuíam autossomos acrocêntricos, organizados em três pares grandes, seis médios e dois pequenos. O cromossomo X, em todas as espécies, apresentou tamanho médio.

O estudo focado na família Romaleidae, especialmente nas quatro espécies mencionadas, trouxe informações cruciais sobre a organização cromossômica. O cariótipo comum em machos, 2n = 23, X0, é característico da família, com cromossomos acrocêntricos, incluindo 2-4 grandes, 5-7 médios e 2-3 pequenos (Mesa *et al*., 1982). Essa conformidade cromossômica é observada em várias espécies, como *Brasilacris gigas, Chromacris speciosa e Xestotrachelus robustus* (Neto *et al*., 2013*), Xyleus discoideus angulatus* (Carvalho, 2008; Souza e Kido, 1995*), Procolpia minor* (Mesa *et al*, 1982), *Radacridium nordestinum* (Rocha *et al*, 1997) *e Tropidacris collaris* (Souza, 2012).

A análise a nível de tribos na família Romaleidae revelou variações consideráveis. Espécies *como Agriacris auripennis e Prionolopha serrata*, pertencentes à tribo Romaleini, diferem na distribuição e tamanho dos cromossomos em comparação com outros gafanhotos da mesma tribo, como por *exemplo Chromacris nuptialis* e *C. speciosa* (Loreto *et al*., 2005) e *Agriacris jucunda* (Mesa *et al*., 2004). O mesmo padrão se aplica a *Epiprora hilaris e Phaeoparia megacephala*, pertencentes à tribo Phaeoparini, com *Phaeoparia megacephala* apresentando 6 pares médios e dois pequenos, por enquanto *Epiprora hilaris* possuem 5 médios e dois pequenos.

No que diz respeito ao número de blocos de heterocromatina constitutiva (HC) ricos em GC, observou-se uma diversidade na distribuição entre as diferentes espécies. *Agriacris auripennis* e *Prionolopha serrata*, por exemplo, apresentaram 3 e 4 pares, respectivamente. Essa variabilidade é comum em gafanhotos da família Romaleidae e em outras famílias, como indicado por diversos estudos (Souza *et al*., 1998; Pereira e Souza, 2000; Souza *et al*., 2003; Anjos *et al*., 2013; Rocha *et al*., 2015).

Por outro lado, *Epiprora hilaris* e *Phaeoparia megacephala* se destacam por apresentarem os extremos de variação. *E. hilaris* exibe região CMA positiva em apenas um par, enquanto *P. megacephala* apresenta blocos em todos os seus cromossomos. Além disso, a localização das regiões CMA positivas revelou diversidade quanto a localização cromossômica podendo estar presente exclusivamente em autossomos ou em autossomos e no cromossomo X, como visto em *A. auripennis* e *P. megacephala*.

Nossos resultados estão em concordância com outros estudos na literatura, que destacam a presença expressiva e heterogênea de regiões CMA positivas em gafanhotos da família Romaleidae. Essa família exibe uma notável variabilidade no tamanho e na localização de blocos de heterocromatina, com uma predominância geral na região Pericentromérica. Entretanto, blocos intersticiais e distais são frequentes, como evidenciado em *Xyleus d.*

angulatus, *Phaeoparia megacephala* e *Xestotrachelus robustus*, nos quais todos os blocos de HC mostraram ser ricos em GC (Souza et al., 1998; Pereira e Souza, 2000; Souza et al., 2003). A heterogeneidade e a expressiva presença de HC rica em GC nas espécies estudadas podem ser explicadas por eventos de rearranjos cromossômicos, amplificação, replicações múltiplas, cruzamento desigual, acúmulo e eliminação (John, 1988), além da ação dos elementos transponíveis, determinantes genéticos da formação da heterocromatina em diferentes organismos (Grewal e Jia, 2007).

Quanto à coloração DAPI, as espécies examinadas neste estudo seguem um padrão comumente encontrado em gafanhotos da família Romaleidae, que não apresentam nenhuma região de HC DAPI positiva. Em muitos insetos, especialmente gafanhotos, as regiões de HC marcadas com fluorocromos geralmente são ricas em GC, como observado em outras espécies como *Chorthippus parallelus* e *C. p. erythropus* (Bella *et al*., 1993), *Podisma pedestris* e *P*. ignatii (Bella *et al*., 1990), *Xyleus d. angulatus* (Souza *et al*., 1998) e *Rhammatocerus brasiliensis* (Loreto *et al*., 2008). No entanto, uma condição única, observada até o momento, ocorre em *Zoniopoda tarsata*, que apresenta grandes blocos de regiões DAPI positivas e nenhuma região CMA positiva, sendo a única espécie com predominância de regiões ricas em AT (Vilardi, 1986; Paradeda, 1989).

Em relação ao gene ribossomal 45S, as espécies apresentam um único sítio. Esse padrão de distribuição também é encontrado em outros gafanhotos da família Romaleidae, como vistos nos estudos de Loreto et al. 2005 e Souza et al. 2003. Além da família Romaleidae, outras famílias possuem estudos citogenéticos de mapeamento do DNAr 45S que corroboram com a hipótese de que nos gafanhotos o padrão de distribuição ancestral deste gene é em apenas um único sítio. Cabral *et al* (2011) verificou esta distribuição em quatro gafanhotos da família ancestral Proscopiidae que apresentaram apenas uma localização do DNAr 45S no sétimo par cromossômico, com este único par como o portador original do cluster DNAr 45S e os sítios extras presentes em duas espécies como um padrão derivado. Outros estudos corroboram com a hipótese de que o DNAr 45S se espalhou pelo genoma dos gafanhotos no decorrer da evolução. Em um estudo com 47 espécies de Acrididae e duas espécies de Romaleidae, Cabrero e Camacho observaram que em 32,7% delas os sítios de DNAr 45S estavam em um único par, em 37,7% o sítio estava localizado em dois pares cromossômicos, e em 30,6% o cluster DNAr 45S estava em múltiplos pares de cromossomos. A alta disseminação do loci de DNAr 45S nos diferentes clados de gafanhotos pode ser explicada por rearranjos cromossômicos, tais como

translocações ou inversões, recombinação ectópica e transposição de algumas sequências de DNAr 45S para novos locais no mesmo ou em diferentes cromossomos, evento observado em diferentes porções do genoma (Sczepanski *et al*. 2013, Barbosa *et al*. 2015).

Apesar das quatro espécies apresentarem apenas um sítio de DNAr 45S, estes estão localizados em pares cromossômicos distintos. *Agriacris auripennis* apresentou o DNAr 45S no cromossomo pequeno(P10) *Prionolopha serrata* e *Epiprora hilaris* apresentaram o sítio no cromossomo M7, já *Phaeoparia megacephala* apresentou um sítio no cromossomo M6. Na família Romaleidae a localização ancestral do loci do DNAr 45S é provavelmente no cromossomo médio seis (M6), com outros gafanhotos desta família apresentando essa mesma configuração, como é o caso de *Chromacris nuptialis* e *C. speciosa* (Neto *et al*., 2013). A presença deste sítio em um cromossomo médio (M7) em *Prionolopha serrata* e *Epiprora hilaris* e pequeno (P10) em *Agriacris auripennis*, possivelmente ocorreu mais tardiamente na história evolutiva dessa família, pelos mesmos mecanismos que permitiu esse loci se disseminar de um para variados loci no genótipo dos gafanhotos.

As quatro espécies investigadas exibiram um único sítio para o gene da histona H3. Esse achado está em consonância com estudos anteriores realizados em diferentes famílias de gafanhotos, como Proscopiidae (Cabrl *et al*., 2011), Acrididae (Cabrero *et al*., 2009), e algumas espécies de Romaleidae (Neto *et al*., 2013). Na família Romaleidae, observou-se, conforme documentado por Neto *et al*. (2013), Machado *et al*. (2014) e Rocha *et al*. (2015), uma notável diversidade na disposição genômica entre diversas espécies, evidenciando uma maior variabilidade na organização genômica dentro dessa família de gafanhotos. É importante destacar que a localização do gene H3 foi preservada de maneira significativa nas espécies *Prionolopha serrata* e *Agriacris auripennis*, ambas pertencentes à tribo Romaleini, com o gene posicionado no cromossomo 9 em ambas as espécies (par M9 de *Prionolopha serrata* e par P9 em *Agriacris auripennis*). Em contrapartida, *Epiprora hilaris* e *Phaeoparia megacephala*, pertencentes à tribo Phaeoparini, apresentaram divergências na localização do gene histona H3, com *Epiprora hilaris* situado no par médio (M7) e *Phaeoparia megacephala* apresentou o sitio no par médio (M8).

Considerando que houve colocalização do sítio de Histona H3 com o sítio do DNAr 45S em *Epiprora hilaris*, isto indica que houve translocação de uma das marcas durante a evolução, ou o sítio de DNAr mudou de posição ou a H3 mudou de posição pois colocalização é um padrão raro entre as espécies de Romaleidae e de outros gafanhotos em geral.

A determinação do sítio ancestral do gene de histona H3 na família Romaleidae permanece como uma questão em aberto, demandando estudos mais abrangentes envolvendo um maior número de espécies dessa família para uma elucidação mais precisa. Apesar de se encontrar em um único sítio na família Romaleidae, como evidenciado em *Chromacris nuptialis*, C. *speciosa*, *Xestotrachelus robustus* e *Brasilacris gigas* (Neto *et al*., 2013), a variação do cromossomo em que esse sítio foi localizado é notável. Por exemplo, em *Chromacris nuptialis*, *C. speciosa* e *Xestotrachelus robustus*, o sítio estava presente no cromossomo G2, enquanto em *Brasilacris gigas*, estava localizado no cromossomo M9, além dos pares 7, 8 e 9, conforme evidenciado nas espécies examinadas neste estudo. Uma possível explicação para essa alta variabilidade de cromossomos distintos portando o gene de histona H3 é a associação deste gene com sequências repetitivas, especialmente elementos transponíveis, os quais podem contribuir para a dispersão dos genes das histonas em diferentes cromossomos (Sczepanski *et al*., 2013; Barbosa *et al*., 2015).

As variações entre as espécies, tanto na presença de regiões CMA+ quanto na localização específica de sítios de DNAr 45S e genes de histona H3, apontam para uma notável diversidade cariotípica dentro da família Romaleidae. Esses resultados contribuem significativamente para o entendimento da organização genômica e evolução cromossômica nesse grupo de gafanhotos.

O estudo destaca a importância de ampliar as pesquisas citogenéticas dentro da família Romaleidae, explorando mais representantes para uma compreensão abrangente da diversidade biológica. A utilização de técnicas avançadas, como FISH, demonstra ser crucial para obter informações detalhadas sobre a localização precisa de genes específicos, abrindo perspectivas para futuras investigações sobre a evolução genômica desse grupo de insetos.

5. **CONCLUSÃO**

Todas as espécies aqui estudadas apresentam cariótipos característicos da família Romaleidae, havendo alguma diferença entre as espécies em relação à organização desse cariótipo.

A análise do CMA/DAPI evidenciou que a heterocromatina das espécies possui blocos ricos em CG localizados na região Pericentromérica e ausência de blocos de heterocromatina ricos em AT.

Os sítios de DNAr 45S e H3 foram localizados em apenas um único par cromossômico cada em Agriacris *auripennis,* Prionolopha *serrata* e *Phaeoparia megacephala.* Ambos os sítios estão no mesmo cromossomo de *Epiprora hilaris.*

REFERÊNCIAS DO ARTIGO

Albig, W., Ebentheuer, J., Klobeck, G., Kunz, J., & Doenecke, D. (1996). A solitary human h3 gene on chromosome 1. Human Genetics, 97(4), 486–491.

Anjos, A., Loreto, V., & Souza, M. J. (2013). Mapeamento cromossômico de genes ribossomais e histona h4 no gênero radacridium (romaleidae). Genetics and Molecular Biology, 36(3), 336–340. doi: 10.1590/s1415-47572013005000026

Barbosa, P., Oliveira, L. A., Pucci, M. B., Santos, M. H., Moreira-Filho, O., Vicari, M. R., ... Artoni, R. F. (2015). Identificação e mapeamento cromossômico de elementos repetitivos no complexo de espécies Astyanax scabripinnis (Teleostei: Characidae). Genetica, 143(1), 55–62. doi: 10.1007/s10709-014-9813-2

Bueno, D., Palacios-Gimenez, O. M., & Cabral-de-Mello, D. C. (2013). Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos no gafanhoto Abracris flavolineata revela possível ancestralidade do cromossomo B e histona H3 espalhando. PLoS ONE, 8(7), e66532. doi: 10.1371/journal.pone.0066532

Barzotti, R., Pelliccia, F., Bucciarelli, E., & Rocchi, A. (2000). Organization, nucleotide sequence, and chromosomal mapping of a tandemly repeated unit containing the four core histone genes and a 5s rRNA gene in an isopod crustacean species. Genome, 43(2), 341–345.

Bella, J. L., Serrano, L., Hewitt, G. M., & Gosálvez, J. (1993). Heterochromatin heterogeneity and rapid divergence of the sex chromosomes in Chorthippus parallelus parallelus and C. p. erythropus (Orthoptera). Genome, 36(3), 542–547.

Bella, J. L., Gosálvez, J., Nichols, R. A., López-Fernández, C., García de la Vega, C., & Hewitt, G. M. (1990). Chromosome divergence in Podisma berthold through the Alps, Pyrenees, and Sistema Ibérico. Bol. San. Veg. Plagas (Fuera de Serie), 20, 349–358.

Bella, J. L., & Gosálvez, J. (1991). C-banding with specific fluorescent DNA-ligands: a new approach to constitutive heterochromatin heterogeneity. Biotech. Histochem., 66(1), 44–52.

Bernardino, A. C. S., Barros, R. P., Godinho, L. R. B., & Loreto, V. (2013). Karyotypic descriptions of neotropical grasshopper species in the state of Pará, Brazil. In: 3a. Reunião Brasileira de Citogenética e IV Simpósio Latino-Americano de Citogenética e Evolução, 2013, Guarujá.

Carvalho, D. (2008). Caracterização cariotípica dos gafanhotos Ommexecha virens e Descampsacris serrulatum (Orthoptera-Ommexechidae) [Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco].

Braga, C. E. S., Gutjahr, A. L., Sovano, R. S. S., Tavares, G. C. (2015). Os gafanhotos Romaleidae (Orthoptera: Acridoidea) da região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. Ciências Biológicas 14, Zoologia 6, Zoologia, 62a Reunião Anual da SBPC.

Cabral-de-Mello, D. C., Martins, C., Souza, M. J., & Moura, R. C. (2010). Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. Cytogenetic and Genome Research.

Cabral-de-Mello, D. C., Cabrero, J., López-León, M. D., & Camacho, J. P. M. (2011a). Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. Genetica, 139, 921–931.

Cabral-de-Mello, D. C., Martins, C., Souza, M. J., & Moura, R. C. (2011b). Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. Cytogenet Genome Res, 132(2-3), 89–93.

Cabrero, J., López-León, M. D., Teruel, M., & Camacho, J. P. M. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. Chromosome Research, 17(3), 397–404. doi: 10.1007/s10577-009-9030-5

Cabrero, J., & Camacho, J. P. M. (1986). Cytogenetic studies in gomphocerine grasshoppers. II. Chromosomal location of active nucleolar organizer regions. Can J Genet Cytol, 28(4), 540–544.

Cabrero, J., & Camacho, J. P. M. (2008). Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Research, 16(4), 595–607. doi: 10.1007/s10577-008-1214-x

Cabrero, J., López-León, M. D., Teruel, M., & Camacho, J. P. M. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. Chromosome Research, doi: 10.1007/s10577-009-9030-5

Carbonell, C. S. (1977). Origin, evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): a preliminary hypothesis. Rev. Soc. Ent. Argentina, 36(1-4), 153–175.

Drouin, G., & Sá, M. M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. Mol. Biol. Evol., 12(3), 481–493.

Gerlach WL, Bedbrook JR. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Res. 1979 Dec 11;7(7):1869-85. doi: 10.1093/nar/7.7.1869.

Gracia, P. M., Bentos, A., & Novello, A. (2008). Comparative study of the grasshopper Zoniopoda tarsata (Romaleide) and Paulinia acuminata (Pauliniidae) based on chromosome and C-banding analysis. Caryologia, 61, 123–127.

Grewal, S. S., & Jia, S. (2007). Heterocromatina revisitada. Nature Reviews Genetics, 8, 35–46. doi: 10.1038/nrg2008

Heng, H. H. Q., Spyropoulos, B., & Moens, P. B. (1997). Fish technology in chromosome and genome research. Bioessays, 19(1), 75–84.

John, B. (1988). A Biologia Da Heterocromatina. In: Verma Rs (Ed.) Heterocromatina: Aspectos Moleculares E Estruturais. Cambridge University Press, Cambridge, 1–47.

Lamond, A. I., & Earnshaw, W. C. (1998). Structure And Function In The Nucleus. Science, 280, 547–553.

López-León, M. D., Cabrero, J., & Camacho, J. P. M. (1999). Unusually High Amount Of Inactive Ribosomal DNA In The Grasshopper Stauroderus Scalaris. Chromosome Research, 7, 83–88.

Loreto, V., & Souza, M. J. (2000). Karyotype, Constitutive Heterochromatin And Nucleolar Organizer Regions (Nors) In Belosacris Coccineipes (Acrididae – Leptysminae). Genetics And Molecular Biology, 23(3), 575–579.

Loreto, V., Stadtler, E., Melo, N. F., & Souza, M. J. (2005). A Comparative Cytogenetic Analysis Between The Grasshopper Species Chromacris Nuptialis And C. Speciosa (Romaleidae). Genetica, 125, 253–260.

Loreto, V., Cabrero, J., López-León, M. D., Camacho, J. P. M., & Souza, M. J. (2008). Possível Origem Autossômica De Cromossomos Macro B Em Duas Espécies De Gafanhotos. Chromosome Research, 16, 233–241. doi: 10.1007/s10577-007-1188-0

Mesa, A., Ferreira, A., & Carbonell, C. S. (1982). Cariologia De Los Acridoideos Neotropicales: Estado Actual De Su Conocimento Y Nuevas Contribuciones. Ann. Soc. Ent. Fr (N. S.), 18, 507–526.

Mesa, A., Garcia-Novo, P., Portugal, C. B., & Miyoshi, A. R. (2004). Karyology Of Species Belonging To The Genera Agriacris Walker 1870 And Staleochlora With Some Considerations Of Romaleid Phallic Structures (Orthoptera, Acridoidea). J Orthoptera Res, 13, 15–18.

Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R., & Miller, O. J. (1976). Suppression Of Human Nucleolus Organizer Activity In Mouse-Human Somatic Hybrid Cells. Exp Cell Res, 101, 235–243.

Moscone, E. A., Matzke, M. A., & Matzke, A. J. M. (1996). The Use Of Combined FISH/GISH In Conjunction With DAPI Countersteining To Identify Chromosomes Containing Transgene Inserts In Amphidiploid Tobacco. Chromosoma, 105, 231–236.

Neto, M. S. R., Souza, M. J., & Loreto, V. (2013). Chromosomal Evolution Of rDNA And H3 Histone Genes In Representative Romaleidae Grasshoppers From Northeast Brazil. Mol Cytogenet, 6, 41.

Pereira, L. G., & De Souza, M. J. (2000). Nature And Distribution Of Constitutive Heterochromatin And Nor Location In The Grasshopper Phaeoparia Megacephala (Romaleidae: Orthoptera). Cytobios, 103(403), 111–119. PMID: 11077973.

Pikaard, C., & Pontes, O. (2007). Heterochromatin: Condense Or Excise. Nat Cell Biol, 9, 19–20. doi: 10.1038/Ncb0107-19

Rocha, M. F., Souza, M. J., & Tashiro, T. (1997). Karyotype Variability In The Genus Radacridium(Orthoptera- Romaleidae). Cytologia, 62, 53–60.

Rocha, M. F., Pine, M. B., Oliveira, E. F., Loreto, V., Gallo, R. B., Da Silva, C. R., Da Rosa, R. (2015). Spreading Of Heterochromatin And Karyotype Differentiation In Two Tropidacris Scudder, 1869 Species (Orthoptera, Romaleidae). Comp Cytogenet, 9(3), 435–450. doi: 10.3897/compcytogen.v9i3.5160. PMID: 26312132; PMCID: PMC4547036

Rocha, M. F., Souza, M. J., & Tashiro, T. (1997). Karyotype Variability In The Genus Radacridium (Orthoptera- Romaleidae). Cytologia, 62, 53-60.

Sczepanski Ts, Vicari Mr, De Almeida Mc, Nogaroto V, Artoni Rf (2013) Organização Cromossômica De Dna Repetitivo Em Sorubim Lima (Teleostei; Pimelodidae). Pesquisa Citogenética E Do Genoma, 141, 309–316. DOI: 10.1159/000353845

Souza, M. J., & Silva-Filha, M. H. N. (1993). Effects of extra chromosome segments on chiasma distribution in Xyleus angulatus (Orthoptera, Romaleidae). Rev. Brasil. Genet., 16, 23-33.

Souza, M. J., Haver, P. R. O., & Melo, N. F. (2003). Karyotype, C- And Fluorescence Banding Patterns, Nor Location And Fish In The Grasshopper Xestotrachelus Robustus (Romaleidae). Caryologia, 56, 261-267. DOI: 10.1080/00087114.2003.10589333

Souza, M. J., Patrícia Rodrigues De O. Haver & Natoniel Franklin De Melo (2003) Karyotype, C- And Fluorescence Banding Patterns, Nor Location And Fish In The Grasshopper Xestotrachelus Robustus (Romaleidae). Caryologia, 56:3, 261-267, DOI: 10.1080/00087114.2003.10589333

Souza, M. J. E Kido, L. M. H. (1995). Variability Of Constitutive Heterochromatin In Karyotypes Of Representatives Of The Family Romaleidae (Orthoptera). Revista Brasileira De Genética, 18(4), 517 – 520.

Souza. Cartografia Genômica Do Gene Period Em Quatro Espécies De Gafanhotos Neotropicais (Orthoptera; Acridoidea). 2012. Tese (Mestrado Em Genética). Universidade Federal De Pernambuco, 2012.

Souza, M. J., Rufas, J. S., & Orellana, J. (1998). Constitutive Heterochromatin, Nor Location And Fish In The Grasshopper Xyleus Angulatus (Romaleidae). Caryologia, 51, 73-80.

Vilardi, J. C. (1986). Parallel polymorphisms for interstitial C-Bands and B-Chromosomes in Zoniopoda Tarsata (Orthoptera: Romaleidae). Caryologia, 39(3-4), 365-380. DOI: 10.1080/00087114.1986.10797799

Zhang, L., Bao, Z., Wang, S., Huang, X. E Hu, J. (2007). Chromosome Rearrangements In Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) Implied Based On Chromosomal Localization Of Histone H3gene In Four Scallops. Genetica, 130, 193-198.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Amedegnato, C. (1974). Les genres dácridiens néotropicaux, leur classification par familles, sous-familles et tribus. Acrida, 3, 193-208.

Allshire, R. C., Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19(4), 229–244. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119

Angus I. Lamond, William C. Earnshaw (1998). Structure and Function in the Nucleus. Science, 280(5363), 547–553. https://doi.org/10.1126/science.280.5363.547

Bernardino, Andrezza Carolina Souza. *Diversificação do polimorfismo de cromossomos B na subespécie de gafanhoto Xyleus discoideus angulatus (Romaleidae) em populações do nordeste brasileiro*. MS thesis. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

Barzotti, R., Pelliccia, F., Bucciarelli, E., & Rocchi, A. (2000). Organization, nucleotide sequence, and chromosomal mapping of a tandemly repeated unit containing the four core histone genes and a 5S rRNA gene in an isopod crustacean species. Genome, 43(2), 341-345. https://doi.org/10.1139/g99-142

Bittar, Ana Cristina. População e danos de gafanhoto desfolhador (Acrididae) em helicônias sob diferentes níveis de sombreamento em Santo Antônio de Pádua, RJ. (2013).

Braga, C. E. S.; Gutjahr, A. l. Sovano, R. S. S.; Tavares, G. C. Os gafanhotos Romaleidae (Orthoptera: Acridoidea) da região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. Ciências Biológicas, 14, Zoologia, 6, Zoologia, 62ª Reunião Anual da SBPC. (2015).

Cabrero, J., López-León, M. D., Teruel, M., Camacho, J. P. (2009). Chromosome mapping of h3 and h4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. Chromosome Research, 17, 397–404.

Cabrero, J., Camacho, J. P. (2003). Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. Chromosome Research, 16(4), 595-607.

Cabral-de-Mello, D. C., Souza, M. J. (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.

Cabral-de-Mello, D. C. et al. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. BMC Genetics, v. 12, p. 1-12, 2011.

Carbonell, C. S. (1977). Origin, evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): a preliminary hypothesis. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 36(1-4), 153-175.

Carbonell, C. S. (1984). Radacridium nordestinum: a new genus and species of Romaleid grasshoppers from the Brazilian caatinga (Orthoptera, Acridoidea). Proc. Acad. Nat. Sci. Phil., 136, 123-129.

Carbonell, C. S. (1986). Revision of the Neotropical genus Tropidacris (Orthoptera, Acridoidea, Romaleidae). Proc. Acad. Nat. Sci. Phil., 138(2), 366-402.

Carbonell, C. S. (2002). The grasshopper Tribe Phaeoparini (Acridoidea: Romaleidae). The Orthopterists Society. The Acad. Nat. Sci. Phil., Pen., 148p.

Carbonell, C. S. (2004). The genus Xyleus Gistel 1848 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). Journ Orthop Res, 13, 63-133.

Carbonell, C. S. (2007). The genus Zoniopoda Stal 1873 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). Journ Orthop Res, 16, 1-33.

Dadd, R. H. (1963). Feeding behaviour and nutrition in grasshoppers and locusts. Adv. Insect Physiol. doi: https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60174-5

De Barros Machado da Silva, C., & José de Souza Lopes, M. (2011). Cromossomo B e mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e histona H3 e H4 no gafanhoto Xyleus discoideus angulatus (Romaleidae). Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Deussing, J. M., Jakovcevski, M. (2017). Histone Modifications in Major Depressive Disorder and Related Rodent Models. In: Delgado-Morales, R. (Eds.) Neuroepigenomics in Aging and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology, 978, Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1_9

Drouin, G., de Sá, M. M. (1995). A evolução concertada dos genes ribossômicos 5S ligados às unidades repetidas de outras famílias multigênicas. Biologia Molecular e Evolução, 12(3), 481–493. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040223

Fernandes, Valéria Dorneles; Pádua, José Augusto. A praga de gafanhotos no Sul da América: Argentina, Brasil e Uruguai (1890-1950). Fronteiras, 7, 145-160, 2018.

Hennig, W. (1999). Heterochromatin. Chromosoma, 108(1–9). https://doi.org/10.1007/s004120050346

Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. Journal of Human Genetics, 58(7), 439–445. https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66

Listre Barreto, AL (2009). Distribuição geográfica das famílias Romaleidae e Ommexechidae (Orthoptera: Acridoidea) no Uruguai.

Loreto, Vilma et al. A comparative cytogenetic analysis between the grasshopper species Chromacris nuptialis and C. speciosa (Romaleidae): constitutive heterochromatin variability and rDNA sites. Genetica, 125, 253-260, 2005.

Mesa, A., Ferreira, A., and Carbonell, C.S. (1982). Cariologia De Los Acridoideos Neotropicales: Estado Actual De Su Conocimento Y Nuevas Contribuciones. Annales de la Société Entomologique de France (Nouvelle Série), 18, 507–526.

Neto, M. S. R., Souza, M. J., & Loreto, V. (2013). Chromosomal Evolution Of rDNA And H3 Histone Genes In Representative Romaleidae Grasshoppers From Northeast Brazil. Molecular Cytogenetics, 6, 41. https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-41

Neto, M.R., de Souza, M.J., & Loreto, V. (2013). Evolução cromossômica dos genes rDNA e histonas H3 em gafanhotos Romaleidae representativos do nordeste do Brasil. Molecular Cytogenetics, 6, 41. https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-41

Pereira, L. G., Souza, M. J., and Haver, P. R. O. (2003). Karyotype, C- and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper Xestotrachelus robustus (Romaleidae). Caryologia, 56, 261-267.

Rocha Mde F, Pine MB, Oliveira EF, Loreto V, Gallo RB, da Silva CR, de Domenico FC, da Rosa R. (2015). Spreading of heterochromatin and karyotype differentiation in two Tropidacris Scudder, 1869 species (Orthoptera, Romaleidae). Comparative Cytogenetics, 9(3), 435-450. https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i3.5160

Souza, M.J., Rufas, J.S., & Orellana, J. (1998). Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper Xyleus angulatus (Romaleidae). Caryologia, 51, 73-80.

Souza, M.J., Haver, P.R.O., & Melo, N.F. (2003). Karyotype, C- and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper Xestotrachelus robustus (Romaleidae). Caryologia, 56, 261-267.

Witt, O., Albig, W., & Doenecke, D. (1996). Expressão específica de testículo de um novo gene de histona H3 humana. Tendências em Bioquímica e Ciências, 30, 357-359. https://doi.org/10.1016/0968-0004(95)10045-2