

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

TYAGO EUFRÁSIO DE SOUZA

CARTOGRAFIA GENÔMICA DO GENE *PERIOD* EM QUATRO
ESPÉCIES DE GAFANHOTOS NEOTROPICAIS (ORTHOPTERA;
ACRIDOIDEA)

RECIFE - PE
2012

TYAGO EUFRÁSIO DE SOUZA

**CARTOGRAFIA GENÔMICA DO GENE *PERIOD* EM QUATRO
ESPÉCIES DE GAFANHOTOS NEOTROPICAIS (ORTHOPTERA;
ACRIDOIDEA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tania Tassinari Rieger

**RECIFE - PE
2012**

Souza, Tyago Eufrásio de

Cartografia genômica do gene period em quatro espécies de gafanhotos neotropicais (Orthoptera; Acridoidea) / Tyago Eufrásio de Souza. – Recife: O Autor, 2012.

48 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tania Tassinari Rieger

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2012.

Inclui bibliografia

**1. Genética – Pesquisa 2. Genética molecular 3. Gafanhoto I.
Título.**

TYAGO EUFRÁSIO DE SOUZA

**CARTOGRAFIA GENÔMICA DO GENE *PERIOD* EM QUATRO
ESPÉCIES DE GAFANHOTOS NEOTROPICAIS (ORTHOPTERA;
ACRIDOIDEA)**

APROVADO EM 29/02/2012

BANCA EXAMINADORA:

**Presidente: Prof.^a Dr.^a Tania Tassinari Rieger
Depto. de Genética/CCB/UFPE**

**1º Examinador: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lauer Garcia
Depto. de Biologia/CAV/UFPE**

**2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia de Moura
Depto. de Biologia/ICB/UPE**

**3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Vilma Loreto da Silva
Depto. de Genética/CCB/UFPE**

**RECIFE - PE
2012**

**À minha família,
que tornou possível mais
uma etapa de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arlene e Genilson, pelo carinho, e minha irmã Tyene, pela compreensão e cumplicidade dedicadas desde o momento que entrei na faculdade. Foram de grande valia para eu poder chegar aonde cheguei. Amo vocês!

Às minhas tias, Bete e Danda, que embora peguem muito no meu pé por conta da minha bagunça e pelo banheiro molhado, amo-as muito, pois deram sua boa parcela de contribuição.

À minha avó Zézé, pelo carinho e amor incondicionais dedicados ao longo desta caminhada; que embora tenha sua visão comprometida vê coisas que muitas vezes não vejo. Amo muito a senhora, minha vó!

À minha querida e amadíssima Luíses, pelo amor e companheirismo dedicados a mim durante esse tempo. Obrigado por me amar, respeitar, e acima de tudo, me suportar. Te amo, meu doce!

Aos Professores, Tania e Ferreira do Laboratório de Experimentação em *Drosophila* (LED), que são de fundamental importância nesta minha caminhada acadêmica, e a todos que fazem ou fizeram parte deste; estagiários, monitores e “agregados”; Evilis, Thati, Nara, Nicole, Diego, Luciana, Terto, Paula, Augusto, Rafaela, Coral, Júlio, Fernanda Ito, Gabrielle, Leandro, Umberto, Bruno, Ítalo, Elis, Karina, Leonardo, Adiles, Fernanda Uchôa, Morse, Jackeline e Jéssica. Valeu pela convivência, companheirismo e pelas “chamadas” do Prof. Tercílio.

A meu amigo Sérgio Campos por ter me apoiado desde o primeiro momento que cheguei no LED, tendo a disponibilidade e paciência de me ensinar boa parte de seu conhecimento em genética. Foi e é de suma importância pra mim!

À Cybelle (*in memoriam*), Bárbara, André, Angélica, Filipe e Marcelo; do LEMTE, pelo apoio à parte molecular deste trabalho. Valeu e muito a cooperação de vocês!

Aos que fazem parte do Laboratório de genética e citogenética animal: Prof.^{as} Neide, Vilma e Maria José, pelo ótimo convívio de trabalho e descontração; Adriana, minha grande amiga; Carol, pela ajuda em alguns de meus dados; Allison, Luiz, Helen, Luana, Marcos, Merilane, Izaquiel, Andrezza, Cibebe, Cirlene, e outros

que deixaram sua contribuição, como Kalyne, Amanda, Diogo, Ituza e Jefferson. Agradeço a Deus por ter me dado ótimos amigos!

À Santelmo, pela grande amizade que construímos e pelo auxílio na montagem das minhas pranchas de figuras.

As minhas amigas de graduação, que ainda tenho contato; Visnu, Diana, Gleice, Lígia e Érica. Valeu pela convivência, cresci muito com vocês!

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro ao projeto.

RESUMO

As espécies de gafanhotos *Ommexecha virens* (Ommexechidae), *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* (Romaleidae) e *Schistocerca pallens* (Acrididae) ocorrem na região do Nordeste do Brasil. Apresentam seus cariótipos simétricos com número cromossômico, $2n=23$ (X0, machos) e $2n=24$ (XX, fêmeas), porém *T. collaris*, *S. pallens* e *X. d. angulatus* apresentam os cromossomos com morfologia acrocêntrica, enquanto que *O. virens* apresenta o par cromossômico G_1 submetacêntrico. Variações rítmicas no comportamento apresentadas por diversos organismos são pertencentes ao ciclo circadiano. Com o uso da técnica de Hibridização *in situ* Permanente (PISH), foi mapeada a posição do gene de cópia única *Per*, um dos genes do relógio circadiano, em cromossomos meióticos das espécies *O. virens*, *X. d. angulatus*, *T. collaris* e *S. pallens*. Os cromossomos meióticos destas espécies foram obtidos através da técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares. As sondas utilizadas foram obtidas de plasmídeos carregando fragmentos do gene *Per* originários do genoma do drosofilídeo *Zaprionus indianus*. Após a hibridização *in situ*, o material foi fotografado usando contraste de fase. Nas quatro espécies de gafanhotos citadas anteriormente, o gene *Per* foi mapeado no maior par autossômico, G_1 . Analisados conjuntamente os resultados de mapeamento do gene *Per* nestas espécies com a localização de outros genes de cópia única e de cópia repetitiva, observa-se uma localização preferencial dos genes de cópia única nos pares autossômicos grandes e, genes de cópia repetitiva, nos pares médios e pequenos. Estes resultados também apontam para uma conservação molecular deste gene nos Orthoptera, como observado em Díptera e Lepdoptera; possivelmente a conservação na localização cromossômica seja um reflexo da conservação molecular. Localizações cromossômicas de diversos genes constitutivos em representantes das famílias Ommexechidae, Romaleidae e Acrididae são informações relevantes para o entendimento das relações evolutivas entre estes gafanhotos, além disso, fornecem marcadores para o sequenciamento do genoma destas espécies.

Palavras-chave: *Period*, Gafanhotos, Hibridização *in situ* Permanente, homologia cromossômica, Evolução.

ABSTRACT

The species of grasshoppers *Ommexecha virens* (Ommexechidae) *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* (Romaleidae) and *Schistocerca pallens* (Acrididae) occur in the Northeast region of Brazil. Present their symmetrical karyotypes with chromosome numbers, $2n = 23$ (X0, males) and $2n = 24$ (XX, females), but *T. collaris*, *S. pallens* and *X. d. angulatus* present the acrocentric chromosome morphology, while *O. virens* shows the submetacentric L_1 chromosome pair. Rhythmic variations in behavior presented by various organisms are belonging to the circadian cycle. Using the technique of Permanent *in situ* hybridization (PISH), has mapped the position of the single-copy gene *Per*, one of the clock genes, in meiotic chromosomes of the species *O. virens*, *T. collaris*, *S. pallens* and *X. d. angulatus*. The meiotic chromosomes of these species were obtained by the classical technique of crushing testicular follicles. The probe used was obtained from plasmids carrying the gene *Per* fragments originating from the genome of drosophilid *Zaprionus indianus*. After *in situ* hybridization, the material was photographed using phase contrast. In the grasshoppers species mentioned above, the *Per* gene was mapped in largest autosomal pair, L_1 . Taken together the results of *Per* gene mapping in these species with the location of other single-copy genes and repetitive copy, there is a preferential localization of single copy genes in large autosomal pairs and copy repetitive genes, the couple pairs and small. These results also point to a molecular conservation of this gene in the Orthoptera, as observed in Diptera and Lepdoptera, possible conservation in chromosomal location is a reflection of molecular conservation. Chromosomal locations of several constituent genes in representatives of the families constituting Ommexechidae, Romaleidae and Acrididae are relevant information for understanding the evolutionary relationships in the locusts, and provides markers for mapping the genome of these species.

Keywords: *Period*, Chromosomal homology, Grasshoppers, Permanent *in situ* hybridization, Evolution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fêmea alada de <i>Ommexecha virens</i> . Fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Aumento = 1X.	6
Figura 2. Fêmea adulta de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> , fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.	8
Figura 3. . Fêmea adulta de <i>Tropidacris collaris</i> . Fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.....	10
Figura 4. Fêmea adulta de <i>Schistocerca pallens</i> , fotografada por Campos, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.....	12
Figura 5. Modelo generalizado do relógio circadiano. Composto basicamente de uma via de entrada, composta por um fotorreceptor acoplado a um mecanismo, que sincroniza um oscilador para o ciclo externo de claro e escuro (o relógio circadiano) e um mecanismo de saída, que gera a resposta biológica (ritmo) em função do estímulo. Adaptado de PAGE, 2005.	14
Figura 6. Estrutura e organização do gene <i>period</i> e seus produtos em <i>Drosophila melanogaster</i> . Extraído de HARDIN & SIWICKI, 1995.....	16
Figura 7. Mecanismos moleculares do relógio circadiano de <i>Drosophila</i> . Maiores detalhes vide texto. Extraído de PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011.	18
Figura 8. Principais etapas da Hibridização <i>in situ</i> permanente (PISH). Adaptado de GUERRA, 2004.....	26
Figura 9. Marcas de hibridização do gene <i>Per</i> em cromossomos meióticos de <i>Ommexecha virens</i> . A , Metáfase apresentando marcação no cromossomo G₁ ; B , Diplóteno apresentando marcação no cromossomo G₁ . Barra= 10µm.....	29
Figura 10. Marcas de hibridização do gene <i>Per</i> em cromossomos meióticos de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> . A , Anáfase apresentando marcação no cromossomo G₁ ; B , Metáfase apresentando marcação no cromossomo G₁ . Barra= 10µm.	29

Figura 11. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Schistocerca pallens*. **A**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo **G₁**; **B**, Diplóteno apresentando marcação no cromossomo **G₁**. Barra= 10µm.....30

Figura 12. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Tropidacris collaris*. **A**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo **G₁**; **B**, Diplóteno apresentando marcação no cromossomo **G₁**. Barra= 10µm.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de espécimes de <i>Ommexecha virens</i> , <i>Xyleus discoideus angulatus</i> , <i>Tropidacris collaris</i> e <i>Schistocerca pallens</i> utilizados neste trabalho coletados em Pernambuco (PE), Piauí (PI) e Bahia (BA), estados do nordeste do Brasil e suas respectivas coordenadas geográficas.....	24
Tabela 2. Frequência absoluta de marcação do gene <i>Period</i> nos autossomos e cromossomo X das espécies <i>Ommexecha virens</i> , <i>Xyleus discoideus angulatus</i> , <i>Schistocerca pallens</i> e <i>Tropidacris collaris</i>	28
Tabela 3. Mapeamento por hibridização <i>in situ</i> de genes de cópia única e repetitiva em cromossomos meióticos das espécies <i>Ommexecha virens</i> (Ommexechidae), <i>Xyleus discoideus angulatus</i> , <i>Tropidacris collaris</i> , (Romaleidae) e <i>Schistocerca pallens</i> (Acrididae).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

45S rDNA	DNA ribossomal 45S
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato
CK2	caseína quinase 2
CLK ..	Fator de transcrição CLOCK
<i>cwo</i>	Gene <i>clockwork orange</i>
CYC..	Fator de transcrição CYCLE
DBT	Quinase Double-Time
<i>Dper</i> .	Gene <i>period</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> fluorescente
G	Cromossomo autossômico grande
<i>Hsps</i>	Genes de resposta à choque térmico
LB	Meio Luria-Bertani
M	Cromossomo autossômico médio
mRNA	RNA mensageiro
NBT	Azul de nitrato tetrazólio
P	Cromossomo autossômico pequeno
pb	Pares de bases
<i>pdp1ε</i>	Gene <i>PAR domain protein 1ε</i>
PDP1ε	Proteína/produto do gene <i>pdp1ε</i>
<i>Per....</i>	Gene <i>Period</i>
PER..	Proteína/produto do gene <i>Period</i>
PISH	Hibridização <i>in situ</i> permanente
PP2A	Proteína fosfatase 2A
RC	Relógio endógeno circadiano
RONs	Regiões organizadoras de nucléolo
SAP	Estreptoavidina/fosfatase alcalina
TG	Região de repetição Treonina-Glicina
<i>Tim</i>	Gene <i>timeless</i>
TIM	Proteína/produto do gene <i>timeless</i>
<i>Ubi</i>	Gene de ubiquitina
<i>vri</i>	Gene <i>vri</i>
VRILLE	Proteína/produto do gene <i>vri</i>
X	Cromossomo X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Características gerais dos gafanhotos	4
2.1.1. <i>Ommexecha virens</i> (Thunberg, 1824)	5
2.1.2. <i>Xyleus discoideus angulatus</i> (Stål, 1873).....	7
2.1.3. <i>Tropidacris collaris</i> (Stoll, 1813).....	9
2.1.4. <i>Schistocerca pallens</i> (Thunberg, 1815)	11
2.2. O ciclo circadiano	13
2.2.1. Gene <i>Period</i> (<i>Per</i>).....	15
2.3. Localização gênica em cromossomos por Hibridização <i>in situ</i>	19
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Coleta de espécimes.....	24
4.2. Dissecção de gafanhotos	24
4.3. Preparação das lâminas	25
4.4. Amplificação e marcação dos plasmídeos	25
4.5. Hibridização <i>in situ</i>	25
4.6. Análise microscópica	26
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular revolucionaram a compreensão sobre a estrutura e função do DNA, possibilitando a localização de genes ou seqüências de DNA em cromossomos metafásicos, meióticos e politênicos de diferentes espécies de animais e a comparação entre cariótipos de espécies próximas em estudos de evolução cromossômica (GUERRA, 2004). A técnica de hibridização *in situ* permite verificar se uma determinada amostra de DNA apresenta homologia com uma sonda, que pode ser um RNA ou outro DNA, sendo um dos métodos mais precisos de identificar a localização genômica e assim mapear genes. Nessa técnica, há desnaturação simultânea da sonda de interesse e do material cromossômico depositado sobre uma lâmina, que posteriormente são hibridizados (LARA, 2002, RIEGER et al., 2006).

Os gafanhotos são insetos pertencentes à ordem Orthoptera, que apresentam metamorfose incompleta (fases de ovo, ninfa e adulto), com formato de corpo e tamanho variável. Condições climáticas adequadas, com chuvas e altas temperaturas, são fatores que propiciam o desenvolvimento do ovo e eclosão das ninfas. As fases de ninfas são semelhantes à fase adulta, porém sem o desenvolvimento total das asas, no caso das espécies aladas (BUZZI, 2005). Várias espécies podem apresentar quiescência, ou seja, parada eventual do desenvolvimento, em qualquer estágio, induzida por condições ambientais desfavoráveis e imediatamente ultrapassada quando reaparecem condições favoráveis (DURATON et al., 1987; BARRIENTOS, 1995). A coincidência entre condições ambientais ótimas e o ciclo biológico de algumas espécies levaria ao processo de gregarização, dependente da densidade populacional e caracterizado pelo comportamento agressivo (IMENES & IDE, 2002).

Famílias como Romaleidae, Pauliniidae, Tristiridae, Ommexechidae e Acrididae fazem parte da superfamília Acridoidea da região Neotropical e são consideradas autóctonas desta região. Mesmo a família Acrididae, que ocorre com distribuição mundial, tem dez subfamílias representadas na região Neotropical, cinco das quais são exclusivas dessa região (CARBONELL, 1977).

A família Ommexechidae apresenta-se como uma família estritamente Neotropical, de origem andino-patagônica, com formas exclusivamente geofílicas e com poucas espécies ocorrentes no Nordeste Brasileiro (MESA & FERREIRA, 1977; RONDEROS, 1978; 1979; MESA et al., 1990).

O gênero *Ommexecha* é considerado o gênero de Ommexechidae que possui maior distribuição geográfica. Das seis espécies conhecidas, apenas uma, *Ommexecha virens* apresenta grande variabilidade fenotípica, ocupando praticamente a metade oriental da área de dispersão deste gênero (RONDEROS, 1978; 1979).

A família Romaleidae apresenta uma grande diversidade de gêneros no Nordeste brasileiro, dos quais os mais abundantes são: *Abila*, *Agriacris*, *Brasilacris*, *Chromacris*, *Helionotus*, *Phaeoparia*, *Radacridium*, *Xestotrachelus*, *Tropidacris* e *Xyleus* (CARBONELL, 1977; SOUZA & SILVA FILHA, 1993; SOUZA et al., 1998).

O gênero *Tropidacris* é representado por três espécies: *Tropidacris cristata*, *Tropidacris collaris* e *Tropidacris descampi*. As espécies deste gênero podem chegar a medir 12 cm de largura (envergadura das asas) e 24 cm de extensão. A espécie *T. collaris* foi registrada em três estados do Nordeste do Brasil: Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Nestes estados, *T. collaris* é considerada uma praga ocasional e localizada que ataca plantas cultivadas e ornamentais (CARBONELL, 1986; BARRIENTOS, 1992).

Pertencente à Família Romaleidae, o gênero *Xyleus* é distribuído em quatro grupos de espécies, os *discoideus* (*X. discoideus*, *X. discoideus discoideus*, *X. discoideus angulatus*, *X. discoideus venezuelae*, *X. discoideus rosulentus*, *X. discoideus mexicanus*), *laevipes* (*X. laevipes*, *X. modestus*, *X. andinus* n. sp., *X. goias* n. sp., *X. regularis*), *attenuatus* (*X. attenuatus*, *X. araguaia*, *X. gracilis*, *X. pirapora*, *X. laufferi*) e *insignis* (*X. insignis*, *X. aimara* n. sp., *X. lineatus*, *X. guarani*). O gênero *Xyleus* é encontrado no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina, geralmente os representantes do gênero são considerados simpátricos e algumas vezes alopátricos (CARBONELL, 2004).

Por sua vez, o gênero *Schistocerca* está incluído na Família Acrididae, apresentando vinte e duas espécies: *S. alutacea*, *S. americana*, *S. beckeri*, *S. brasiliensis*, *S. brevis*, *S. camerata*, *S. centralis*, *S. ceratiola*, *S. damnifica*, *S.*

diversipes, *S. flavofasciata*, *S. gorgona*, *S. literosa*, *S. magnifica*, *S. matogrosso*, *S. melanocera*, *S. nitens*, *S. obscura*, *S. orinoco*, *S. pallens*, *S. quisqueya* e *S. subspurcata*. O gênero *Schistocerca* está distribuído no Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, México e Venezuela (DIRSH, 1974).

Os ritmos circadianos são oscilações endógenas que ocorrem em aproximadamente 24 horas impulsionado por um mecanismo de temporização chamado relógio circadiano. Em insetos, o ritmo pode ser observado em uma variedade de funções fisiológicas, tais como a eclosão, locomoção e estridulação.

Em *Drosophila melanogaster*, um dos insetos mais estudados, os genes-relógio *Period* (*Per*) e *Timeless* (*Tim*) codificam as principais proteínas do ciclo (LANKINEN & FORSMAN, 2006). As proteínas CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), codificadas pelos genes *Clock* (*Clk*) e *Cycle* (*Cyc*), respectivamente, formam um heterodímero afim de promover a transcrição de *Per* e *Tim* durante o amanhecer. As proteínas, PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM), produtos dos genes *Per* e *Tim*, respectivamente aumentam durante a noite, e forma um heterodímero, que ao entrar no núcleo a noite, se ligam a complexos CLK-CYC para suprimir a atividade transcricional destes durante a noite.

Por intermédio da técnica de hibridização *in situ*, podem ser usadas sondas específicas para segmentos cromossômicos para estabelecer homologias entre cromossomos de gêneros, famílias e até mesmo de espécies diferentes. À medida que os estudos na Ordem Orthoptera avançam, pode-se estabelecer um maior número de homologias e até sentenias entre as espécies, o que é de uma fundamental importância para a contribuição do entendimento dos mecanismos evolutivos, bem como um importante marcador para o mapeamento dos genomas das espécies estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais dos gafanhotos

Com mais de 20.000 espécies, a ordem Orthoptera apresenta distribuição mundial, mas são mais diversificados nos trópicos (MARANHÃO, 1976; GALLO et al., 2002). O tamanho do corpo varia de menos de 5 cm a 11,5 cm, podendo ser vista envergaduras com mais de 22 cm. Ortópteros são um componente comum da fauna de insetos terrestres e incluem algumas das pragas mais vorazes.

Os membros de ambas as subordens, Caelifera e Ensifera, são geralmente fitófagas, mas muitas espécies são onívoros. As fêmeas da maioria das espécies fazem desovas de ovos, seja no solo ou na vegetação. Alguns dos melhores exemplos de coloração são vistos em grupo, envolvendo imitação de folhas e outras vegetações (BUZZI, 2005; DURATON et al., 1987; GALLO et al., 2002).

A subordem Caelifera consiste em duas infraordens Tridactylidea e Acrididea (SONG, 2010). Tridactylidea contém uma única superfamília: Tridactyloidea, que consiste em três famílias: Cylindrachetidae, Ripipterygidae e Tridactylidae. Acrididea consiste em sete superfamílias: Acridoidea, Eumastacoidea, Pneumoroidea, Pyrgomorphoidea, Tanaoceroidea, Trigonopterygoidea e Tetrigoidea. As primeiras seis superfamílias são os ditos gafanhotos e, portanto, agrupados nos Acridomorpha, que consiste em um grupo monofilético (FLOOK & ROWELL, 1997a; 1997b; ROWELL & FLOOK, 1998; FLOOK et al., 1999; 2000; MESA & FERREIRA, 1981; SONG, 2010).

Gafanhotos são peculiares entre os animais em ter alguns dos maiores conhecidos genomas nucleares: 5950-20600 Mb (BENSASSON et al., 2001a). A maioria dos genomas de insetos estão entre 98 e 8900 Mb de tamanho e do genoma humano é de cerca de 3.400 Mb. Além disso, o primeiro relato de fragmentos nucleares-mitocondriais (NUMTS), que são fragmentos não-funcionais do DNA mitocondrial integrado no genoma nuclear (LOPEZ et al., 1994), ocorreu em *Locusta migratoria* (GELLISSEN et al., 1983). Nesta espécie existe uma cópia de um gene do RNA ribossomal mitocondrial encontrado no genoma nuclear. Desde então, os gafanhotos se tornaram organismos modelo

para estudar a evolução de NUMTS (BENSASSON et al., 2000; BENSASSON et al., 2001b; SWORD et al., 2007; SONG et al., 2008). A hipótese é que uma parte importante do genoma de gafanhoto é não codificante (BENSASSON et al., 2001b). Ao mesmo tempo, os gafanhotos são conhecidos por abrigar a maior quantidade de NUMTS. Essas duas observações levaram à hipótese de que um tamanho grande do genoma nuclear está correlacionado com o aumento do número de NUMTS, porque os fragmentos de mtDNA continuam a acumular na região não codificante do genoma nuclear (BENSASSON et al., 2000; SONG, 2010).

Acridoidea é a maior superfamília dentro de Orthoptera e contém cerca de 11 famílias e cerca de 7680 espécies, definida pela morfologia do complexo fállico masculino e a falta de fenda basioccipital, entre outras características (AMÉDÉGNATO, 1974; KEVAN, 1982; EADES, 2000; SONG, 2010). Destas famílias, Ommexechidae, Romaleidae, Tristiridae são endêmicas desta região com provável origem na América do Sul. Embora Acrididae possua distribuição mundial, apresenta dez subfamílias representadas na região Neotropical, cinco das quais são exclusivas dessa região (CARBONELL, 1977).

2.1.1. *Ommexecha virens* (Thunberg, 1824)

Ommexecha é considerado o gênero de Ommexechidae que possui maior distribuição geográfica sendo encontrado do Leste da Cordilheira dos Andes desde o Caribe até os 38° de latitude Sul, aproximadamente. Das seis espécies conhecidas, apenas uma, *Ommexecha virens* apresenta grande variabilidade fenotípica, tanto morfológica quanto cromática, ocupando praticamente a metade oriental da área de dispersão deste gênero; os representantes, com exceção de *Ommexecha macropterum*, ocupam territórios ao largo do flanco oriental dos Andes. Este gênero é fileticamente próximo de *Descampsacris* e *Pachyossa*. São notadamente geofílicos, associados à ambientes xerófilos (RONDEROS, 1979; 1978). Segundo RONDEROS (1978) *O. servillei* e *O. germani* são sinônimos de *O. virens*; *O. caerulans* como sinonímia de *O. macropterum* e *O. walkeri* como sinonímia de *O. gracilis*.

Ommexecha virens é um gafanhoto de tamanho pequeno variando de 1,5 cm (macho) a 2 cm (fêmea), com forma robusta, aspecto verrugoso, cor verde ou castanha, podendo ser áptero ou ter asas curtas (de tamanhos variados), deslocam-se principalmente por saltos, o que lhe dá uma baixa mobilidade (**Figura 1**). Esse gafanhoto vive em cerrados, costuma ser encontrados em solos arenosos e terrenos baldios. Sua principal alimentação é *Acanthospermum australe* (família das compostas) (DURATON et al., 1987; RONDEROS, 1979).

A família Ommexechidae tem sido estudada intensamente do ponto de vista citológico, de modo que atualmente se conhece os cariótipos das espécies na totalidade de seus gêneros. A família apresenta o número cariotípico $2n = 23$ cromossomos, em machos e 24 cromossomos, em fêmeas, e sistema sexual $X0, XX$. O cariótipo é constituído por um par de cromossomos submetacêntricos (G_1) e dez pares de cromossomos acrocêntricos, subdivididos em três grupos de tamanho: grandes ($G_2 - G_3$), médios ($M_4 - M_8$) e pequenos ($P_9 - P_{11}$), mais o cromossomo X , sendo este considerado um cromossomo médio. Dezesesseis espécies entre as 19 estudadas por MESA et al., (1982) apresentam um par cromossômico submetacêntrico, sugerindo que as espécies atuais derivam de uma espécie ancestral na qual teria ocorrido uma inversão pericêntrica em um dos cromossomos grandes (MESA, 1963; MESA & FERREIRA, 1977; MESA et al., 1982; 1990; CARVALHO et al., 2011).



Figura 1. Fêmea alada de *Ommexecha virens*. Fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Aumento = 1X.

2.1.2. *Xyleus discoideus angulatus* (Stål, 1873)

O gênero *Xyleus* pertence à família Romaleidae, subfamília Romaleinae. Está distribuído em quatro grupos de espécies com base na análise de caracteres externos: Grupo *Discoideus*, com as subespécies de *Xyleus discoideus* (*X. discoideus discoideus*, *X. discoideus angulatus*, *X. discoideus venezuelae*, *X. discoideus rosulentus* e *X. discoideus mexicanus*), além dos grupos *Laevipes*, *Attenuatus* e *Insignis* (CARBONELL, 2004).

Os gafanhotos do gênero *Xyleus* apresentam tamanho médio, os maiores machos chegam a medir de 44 a 49 mm (*rosulentus*, *mexicanus*, *discoideus*), e os menores medem aproximadamente de 31 mm (*guarani*) e 32 mm (*moderatus*, *regularis*). As maiores fêmeas medem de 62 a 70 mm (*rosulentus*, *discoideus* e *mexicanus*), e as menores de 37 a 40 mm (*camposi*, *guarani*, *moderatus* e *regularis*) (CARBONELL, 2004).

As características morfológicas são muito similares dentro do gênero, apresentando alguns detalhes diferenciais. As antenas são pouco resistentes e fusiformes; os olhos são grandes e proeminentes, maiores nos machos e menores nas fêmeas; o fastigium é triangular e dorsalmente escavado; o pronotum é dorsalmente elevado cortado com sulcos bem definidos, onde a crista pronotal é dividida em quatro lóbulos, variando a altura de acordo com a espécie; as asas são bem desenvolvidas em todas as espécies, exceto em *X. camposi*. A coloração é uniforme entre as espécies com bordas coloridas sombreadas de marrom fosco (CARBONELL, 2004).

A análise citogenética convencional evidenciou que o conjunto cromossômico da espécie *X. discoideus angulatus* (**Figura 2**) consiste de $2n = 23$ cromossomos para machos e $2n = 24$ para as fêmeas, devido ao sistema sexual $X0/XX$, respectivamente. Todos os cromossomos possuem uma constituição morfológica do tipo acrocêntrica. Os cromossomos também foram classificados em três grupos de acordo com o tamanho: três pares cromossômicos grandes ($G_1 - G_3$), cinco pares médios ($M_4 - M_8$) e três pares pequenos ($P_9 - P_{11}$). O cromossomo X é de um tamanho médio, localizando-se entre os pares 3 e 4. (SOUZA & SILVA-FILHA, 1993; SOUZA & KIDO, 1995). A família Romaleidae apresenta poucos casos de polimorfismos para

cromossomos B descritos na literatura. Provavelmente, devido ao fato de não ser extensivamente investigada. Os dois únicos exemplos são *Zoniopoda tarsata* (VILARDI, 1986), com dois morfotipos de Bs; suas diferenças morfológicas sugerem que a origem desses elementos tenha ocorrido independentemente. E, a outra espécie, com ampla distribuição na região Nordeste do Brasil, é *Xyleus discoideus angulatus* (SOUZA & KIDO, 1995), cujas fêmeas apresentaram uma variação de 1 a 2 cromossomos extras em suas células.



Figura 2. Fêmea adulta de *Xyleus discoideus angulatus*, fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.

2.1.3. *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813)

Pertencente à família Romaleidae, o gênero *Tropidacris* é caracterizado por serem os maiores gafanhotos da Região Neotropical. As espécies deste gênero são arbóreas e consideradas uma ameaça à folhagem de uma grande variedade de vegetais, tais como: coqueiros, abacateiros, bananeiras, mangueiras, seringueiras, e plantas ornamentais. Algumas espécies chegam a medir cerca de 12cm de largura, com 24cm de extensão, como no caso do *Tropidacris cristata*, Dux (BARRIENTOS, 1992; 1995).

Este gênero é bem distribuído desde o Sudoeste do México até a Argentina e é representado por três espécies: *Tropidacris cristata*, a qual é composta por três subespécies: *T. c. cristata*, *T. c. dux* e *T. c. grandis*; *Tropidacris collaris* e *Tropidacris descampi*, ressaltando-se que as duas primeiras são simpátricas, que *Tropidacris collaris* possui maior distribuição (CARBONELL, 1986).

As ninfas do gênero *Tropidacris* possuem a cor negra com franjas vermelhas e são consideradas gregárias. As ninfas da espécie *Tropidacris collaris* apresentam antenas inteiramente amarelas, a cabeça possui regiões uniformes, marrom/ esverdeadas e bandeada de amarelo ou laranja, *pronotum* de cor escura com áreas amarelas, laranja, e suas asas são desde cinza escuro até preto, franjadas de amarelo. As ninfas podem ser observadas em pequenos grupos nas árvores baixas, porém, quando adultos estão dispersos, possuem um vôo muito potente semelhante ao de um pássaro. O ciclo biológico é pouco conhecido, mas sabe-se que sua reprodução é contínua com uma só geração ao ano (CARBONELL, 1986; DURATON et al., 1987). *Tropidacris collaris* (**Figura 3**) é considerada uma praga ocasional. Esta espécie tem sido encontrada na América Central, Costa Oeste da Colômbia, Equador e Sul do Caribe (CARBONELL, 1986).

O cariótipo de *Tropidacris collaris*, está constituído por $2n = 23$ cromossomos, em machos e $2n = 24$ cromossomos, em fêmeas, com sistema sexual X0/XX, respectivamente. Os cromossomos apresentam morfologia acrocêntrica e foram classificados de acordo com o seu tamanho em dois pares grandes (**G₁** e **G₂**), seis pares médios (**M₃** – **M₈**) e três pares pequenos (**P₉** –

P₁₁), onde o cromossomo X foi considerado o maior dos médios (ROCHA, 2002)*.



Figura 3. Fêmea adulta de *Tropidacris collaris*. Fotografada por Campos, 2005, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.

*ROCHA, M.F. Caracterização citogenética em espécies de gafanhotos das famílias Acrididae e Romaleidae (Orthoptera). Recife, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2002.

2.1.4. *Schistocerca pallens* (Thunberg, 1815)

Schistocerca é um gênero que pertence à família Acrididae e à subfamília Cyrtacanthacridinae. As espécies deste gênero, em especial *Schistocerca pallens*, são causadoras de sérios prejuízos à agricultura, devastando plantações, pastagens e vegetações de áreas próximas. Além de devastadoras, as nuvens migratórias de gafanhotos deste gênero chamam a atenção pela agregação massal, que é atribuída a condições ecológicas favoráveis que facilitam a sobrevivência da espécie em diferentes estágios do desenvolvimento (DURATON et al., 1987; GALLO et al., 2002).

A subfamília Cyrtacanthacridinae é composta por cerca de trinta gêneros, que estão distribuídos nas regiões Tropical e Subtropical. O gênero *Schistocerca* apresenta um grande número de espécies e subespécies distribuídas na América do Norte, Sul e Central (DIRSH, 1974). Sua origem é de difícil explicação. Há uma hipótese que relata ser africana a origem do gênero *Schistocerca* e que um ancestral comum da espécie migrou para as Américas (CARBONELL, 1977).

O gafanhoto *Schistocerca pallens* (**Figura 4**) é também encontrado no Estado de Pernambuco. É um inseto considerado de tamanho médio, medindo o macho de 4 a 5cm e a fêmea de 5 a 6,5cm; as antenas são longas; o pronotum é fusionado e composto por 26-27 segmentos; as asas são do tipo tégmina, os élitros são manchados de castanho por uma faixa longitudinal amarelo creme na área costal. A coloração geral pode apresentar uma variação de marrom claro para marrom escuro ou com estas duas cores juntas (DIRSH, 1974; DURATON et al., 1987; ZAHLER, 1987).

Segundo SOUZA & MELO (2007), os estudos citogenéticos com o gênero *Schistocerca* não são abundantes na literatura, porém por meio de técnicas de coloração convencional, foi demonstrado que o cariótipo básico de *S. pallens* é representado pelo número diploide, $2n = 23$, X (machos) e $2n = 24$, XX (fêmeas). Quanto à constituição morfológica, todos os cromossomos foram considerados acrocêntricos e classificados de acordo com seus tamanhos em três pares de cromossomos grandes (**G₂ – G₃**), cinco médios (**M₄ – M₈**) e três pequenos (**P₉ – P₁₁**), sendo o cromossomo **X** enquadrado na classe dos médios, correspondendo em tamanho ao quarto par do conjunto cromossômico

(SOUZA & MELO, 2007). Neste mesmo artigo também foi estudada a espécie *S. flavofasciata*. Em ambas as espécies a técnica de bandeamento C evidenciou a presença de heterocromatina constitutiva pericentromérica em todos os cromossomos, porém, em *S. flavofasciata* houve a presença adicional de blocos de heterocromatina distal no par cromossômico 9. Contudo, a técnica de coloração com nitrato de prata revelou RONS intersticial em bivalente de tamanho médio, provavelmente o **M₅**, em *S. flavofasciata*. Já em *S. pallens* esta técnica identificou que as RONS estão localizadas intersticialmente nos bivalentes **M₅** e **M₆**. A técnica de FISH utilizando a sonda rDNA 45S evidenciou sinais de marcação nos bivalentes **M₅** e **M₆**, coincidindo com as RONS. RIEGER et al., (2007) localizaram genes de cópia única como *Hsp70*, *Hsp83*, *Hsp27* e *Ubi*, por intermédio da técnica de hibridização *in situ* permanente, em cromossomos meióticos de *Schistocerca pallens*. As marcas principais dos genes *Hsp70*, *Hsp83*, *Hsp27* e *Ubi* foram verificadas nos cromossomos **G₂**, **M₇**, **G₁** e **M₄**, e **G₂** respectivamente.



Figura 4. Fêmea adulta de *Schistocerca pallens*, fotografada por Campos, em câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-P73. Sem aumento.

2.2. O ciclo circadiano

A presença de um ciclo (relógio) circadiano é um fenômeno biológico universal conservado ao longo da evolução (YOUNG, 2000; MEYER-BERNSTEIN & SEHGAL, 2001; HENDRICKS, 2003; KOH et al., 2006; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011). A natureza universal do sistema circadiano é um indicativo de sua relevância fisiológica (BAE et al., 1998; HARDIN, 1998; SHAFER et al., 2004). Ritmos biológicos diversos têm sido documentados na maioria das espécies, incluindo organismos unicelulares, plantas, insetos, aves e mamíferos (WILSBACHER & TAKAHASHI, 1998; DUNLAP, 1999; PICCIN et al., 2000; GIEBULTOWICZ et al., 2001). Em seres humanos, por exemplo, os ritmos dos ciclos sono-vigília, temperatura corporal, secreções hormonais, pressão sanguínea e o metabolismo do fígado são apenas alguns dos fenômenos regulados por um relógio circadiano (LAKIN-THOMAS, 2000; HENDRICKS, 2003; GARAULET & MADRID, 2011).

O relógio endógeno circadiano (RC) não só gera os ritmos biológicos, mas também sincroniza, ou prepara, o organismo ao seu ambiente externo. Isso fornece ao organismo a principal vantagem de ser capaz de antecipar o ambiente que muda de forma regular e cíclica (SAEZ & YOUNG, 1996; LEE et al., 1999; HENDRICKS, 2003; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011). Um dos mais poderosos estímulos ambiental é a luz. A maioria dos organismos que são sincronizados com o ciclo dia-noite também são capazes de ajustar seus relógios em resposta a pulsos de luz (SEHGAL, 1995b; YOUNG, 2000; YANG & SEHGAL, 2001). No entanto, estímulos não-luminosos, como a temperatura e o comportamento social, também pode causar ajustes no relógio circadiano (LIN et al., 2001; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

Embora o mecanismo do relógio, em geral, é conservado através das espécies, a sua localização morfológica difere. Por exemplo, em *Drosophila*, o relógio circadiano está localizado em um pequeno conjunto de oito neurônios laterais. Por sua vez, no hamster, o relógio é composto por cerca de 10 mil neurônios do núcleo supraquiasmático (MATSUMOTO et al., 1999; CHILOV et al., 2001; DE LA IGLESIA et al., 2004; PEDERSEN et al., 2005). Todavia, foi demonstrado ao nível celular e molecular, que em todos os organismos, cada

célula individual contém um relógio funcional oscilador (DE LA IGLESIA et al., 2004). A capacidade do relógio circadiano de ajustar-se em resposta a estímulos também é conferida a células individuais. Esta informação ajudou a instigar a investigação acerca dos mecanismos do relógio circadiano de organismos simples, com o pressuposto que estes mecanismos serão conservados nas formas estruturais mais complexa de relógio circadiano (MEYER-BERNSTEIN & SEHGAL, 2001; PEDERSEN et al., 2005; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

O sistema circadiano pode ser dividido em essencialmente três componentes: o caminho de entrada, que transmite as informações do ambiente para o relógio; o mecanismo do relógio, em si, e uma via de saída, que transmite a informação temporal do relógio, como visto na **Figura 5** (MEYER-BERNSTEIN & SEHGAL, 2001).

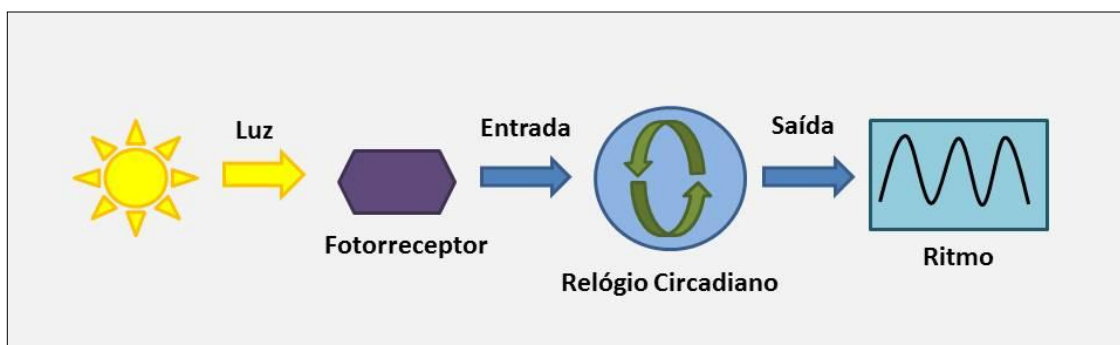


Figura 5. Modelo generalizado do relógio circadiano. Composto basicamente de uma via de entrada, composta por um fotorreceptor acoplado a um mecanismo, que sincroniza um oscilador para o ciclo externo de claro e escuro (o relógio circadiano) e um mecanismo de saída, que gera a resposta biológica (ritmo) em função do estímulo. Adaptado de PAGE, 2005.

A saída do relógio se manifesta através de ritmos fisiológicos e comportamentais (GARAULET & MADRID, 2011). Embora a relação destes componentes do sistema circadiano parece ser discreta, a distinção entre eles se torna difícil, pois a presença de várias vias de retroalimentação continuam a serem descritas (YOUNG, 2000; GROTEWIEL et al., 2005; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

Uma característica constante do mecanismo do relógio circadiano é a presença de pelo menos um ciclo de realimentação molecular (SEHGAL, 1995b; DUNLAP, 1999). Em geral, um ciclo de realimentação molecular consiste dos reguladores positivos que iniciam a transcrição dos outros genes

do relógio, cujos produtos eventualmente regulam negativamente a sua própria transcrição (YOUNG, 2000). Até então, os componentes moleculares de *loops* de *feedback* circadianos têm sido descrito em várias espécies, inclusive em cianobactérias, no fungo *Neurospora crassa*, em *Drosophila melanogaster* e no camundongo (*Mus musculus*) (PEDERSEN et al., 2005; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011)

Em todas essas espécies, as características do relógio circadiano são notavelmente semelhantes, embora os componentes reais podem diferir, sugerindo que o mecanismo do relógio, tenha evoluído através de evolução convergente (PICCIN et al., 2000; YANG & SEHGAL 2001; HENDRICKS, 2003; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

2.2.1. Gene *Period* (*Per*)

Este foi o primeiro gene do relógio circadiano a ser descrito, tendo sido primeiramente identificado em *Drosophila melanogaster*, devido a seus efeitos no ciclo circadiano, por Benzer e Konopka na década de 1970 (HARDIN & SIWICKI, 1995; STANEWSKY et al., 1997; TYSON et al., 1999). Após submeter linhagens de *Drosophila* a mutagênese química, eles selecionaram moscas com alterações no comportamento circadiano e observaram linhagens mostrando incomuns períodos de eclosão; apresentando período de eclosão mais longo (29 horas), mais curto (19 horas) e que não apresentava um padrão de eclosão. Foi verificado que todas as três linhagens de moscas tinham uma mutação no *locus* do mesmo gene, localizado no cromossomo X. Este locus foi chamado *period* (*per*), e os mutantes designados como *period*^{Long}, *period*^{Short} e *period*⁰¹ para os três fenótipos descritos, respectivamente (KONOPKA & BENZER, 1971; KONOPKA, 1987). Posteriormente, este gene foi encontrado no genoma de mamíferos, atuando de forma semelhante no ciclo circadiano (BAE et al, 1998; MEYER-BERNSTEIN & SEHGAL, 2001; VIELHABER et al., 2001; KO & TAKAHASHI, 2006). Em *Drosophila*, este gene está relacionado com o ritmo de som de corte e com a formação da memória de longo prazo (SAKAI et al, 2004). Muitos autores o consideram, inclusive, um gene de

especiação (TAUBER et al., 2007; SANDRELLI et al., 2007; KNOWLES et al., 2009).

O gene *per* de *D. melanogaster* (*dPer*) está localizado na porção 3B1-2 do cromossomo X e tem tamanho aproximado de 4,5 Kb. Três transcritos (*mRNA_{Per}*) desse gene, gerados por processamento alternativo, foram identificados através de análises de clones de cDNA e codificam três isoformas da proteína Period (PER) (HARDIN & SIWICKI, 1995; NUMANO et al., 2006). O transcrito mais recorrente é o tipo A, que apresentam oito éxons e sete íntrons originais, gerando um polipeptídeo com aproximadamente 1200 aminoácidos. O tipo B apresenta um íntron adicional na região 3' UTR e um sítio de *splicing* do éxon 5, que remove 96 aminoácidos no polipeptídeo resultante. O tipo C apresenta remoção de 4 íntrons, alterando os últimos 149 aminoácidos à uma sequência de 107 aminoácidos no polipeptídeo resultante (SAEZ & YOUNG, 1988; HARDIN & SIWICKI, 1995).

A proteína PER apresenta três regiões (C1, C2 e C3) que são conservadas entre Dípteros e Lepidopteros. Apresenta um domínio PAS, que está envolvido na formação de dímeros (homogêneos e heterogêneos) da proteína e uma região de repetição Treonina-Glicina (TG) que está envolvida nos padrões de sons de corte e na compensação de temperatura no ciclo circadiano, como visto na **Figura 6** (HARDIN & SIWICKI, 1995; WILSBACHER & TAKAHASHI, 1998).

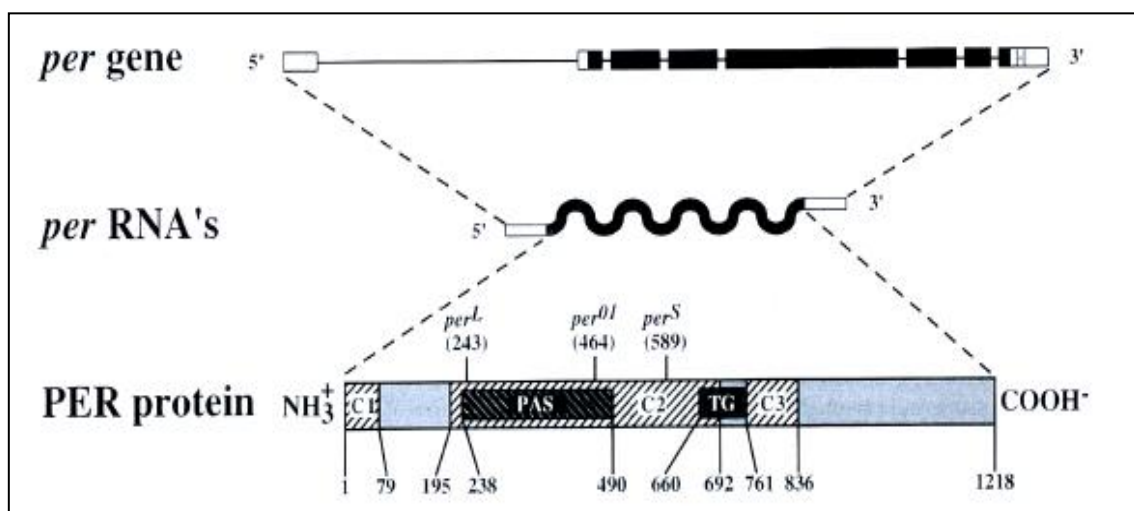


Figura 6. Estrutura e organização do gene *period* e seus produtos em *Drosophila melanogaster*. Extraído de HARDIN & SIWICKI, 1995.

A proteína PER apresenta um papel central no ciclo circadiano (BAE et al., 1998; DUNLAP, 1998; KYRIACOU & HASTINGS, 2001; HIRAYAMA et al. 2003a; DE LA IGLESIA et al., 2004). De acordo com modelos atuais (YOUNG, 2000; MEYER-BERNSTEIN & SEHGAL, 2001; HENDRICKS, 2003; SHAFER et al., 2004; KO & TAKAHASHI, 2006; ARBLE et al., 2010; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011), o domínio hélice-alça-hélice dos fatores de transcrição CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) se ligam como heterodímeros a seqüências *E-Box* (CACGTG) durante o dia (CHILOV et al., 2001; HARDIN, 2004; TAYLOR & HARDIN, 2008). *E-Box* são encontradas na região promotora de muitos genes circadianos como *period*, *timeless* (*tim*), *vri* (*vri*) e *PAR domain protein 1ε* (*pdp1ε*), mas o centro do sistema circadiano representa a ativação de *per* e *tim* (MCDONALD et al., 2001; HARDIN, 2004). O subsequente aumento do mRNA de *per* e *tim* no final da tarde leva ao acúmulo das proteínas PER e TIM no citoplasma, mas este acúmulo é otimizado apenas depois do anoitecer, devido à sensibilidade à luz da TIM e ao fato de que TIM estabiliza PER (SEHGAL, 1995a; SO et al., 2000; SHAFER et al., 2002). Sem a ligação à TIM, PER é fosforilada pela quinase Double-Time (DBT), ubiquitinada pela proteína SLIMB e degradada no proteossoma (MATSUMOTO, 1999; PREUSS et al., 2004; WÜLBECK et al., 2005). A degradação de PER é contrabalançada pela proteína fosfatase 2A (PP2A) (GIEBULTOWICZ et al., 2001). PER e TIM, em seguida, entram no núcleo, sozinhas ou sob a forma de um heterodímero (SAEZ & YOUNG, 1996). DBT, uma vez associada a PER pode entrar no núcleo (SURI et al., 2000). Esse transporte é mediado por fosforilação pela caseína quinase 2 (CK2) (PREUSS et al., 2004; MORIYAMA et al., 2008).

Dentro do núcleo o complexo PER-DBT-TIM se acumula e liga-se a dímeros CLK/CYC através de uma interação CLK-PER (VIELHABER, 2001; HIRAYAMA et al., 2003b). Essa interação faz com que haja hiperfosforilação do complexo e, assim, evita que dímeros CLK/CYC se liguem às regiões *E-Box*, com isso inibindo a transcrição de *tim* e *per*, fechando um ciclo de *feedback* negativo (LEE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 1999; HALL, 2000; STANEWSKY, 2002). Tais vias, citadas no texto, podem ser vistas na **Figura 7**.

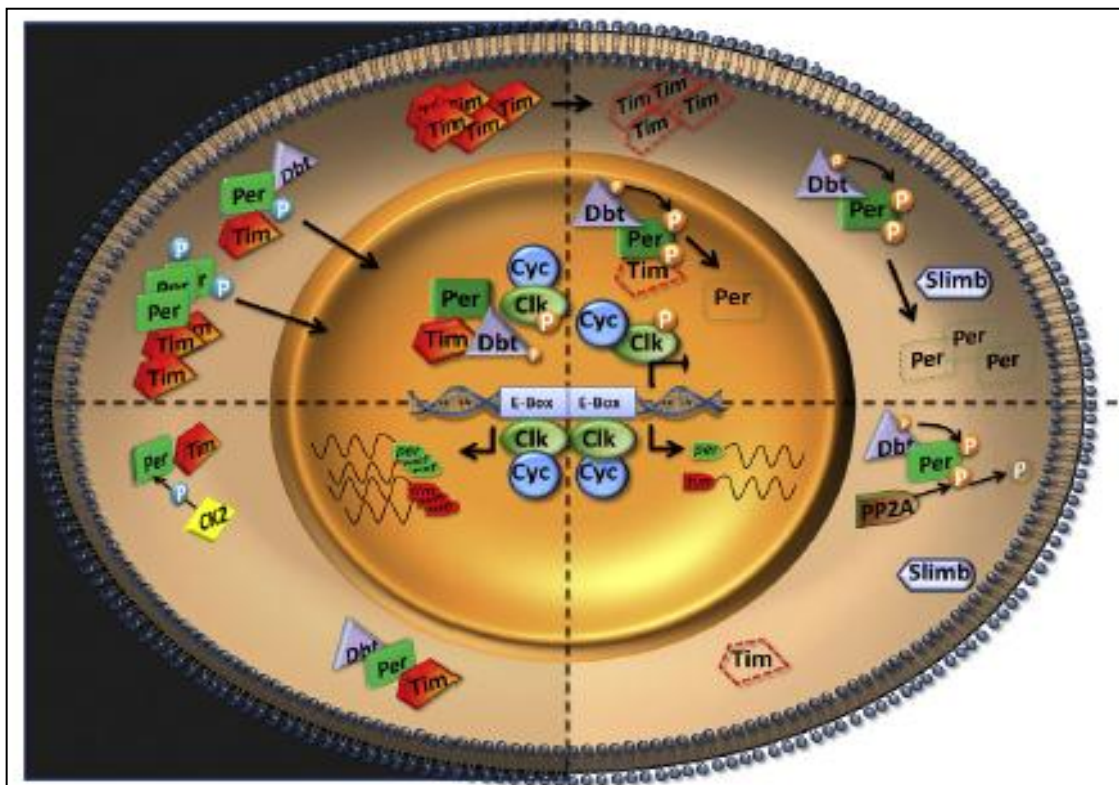


Figura 7. Mecanismos moleculares do relógio circadiano de *Drosophila*. Maiores detalhes vide texto. Extraído de PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011.

Um segundo ciclo de realimentação regula a transcrição de *Clk* (LEE et al., 1999; TYSON et al., 1999; HIRAYAMA et al., 2003b). O mRNA de *Clk* é transcrito de forma recíproca à via de transcrição de *tim/per*, apresentando horários de pico no final da noite e começo da manhã. Dímeros CLK/CYC ativam a transcrição de duas proteínas básicas com domínios zipper de leucina, VRILLE e PDP1 ϵ (TAYLOR & HARDIN, 2008). Ambas as proteínas ligam-se à *V/P Box* na região promotora do gene *Clk*. Enquanto VRILLE inibe a transcrição de *Clk*, PDP1 ϵ ativa sua transcrição (IVANCHENKO et al., 2001; LIN et al., 2001).

No entanto, os resultados recentes indicam que a modificação da proporção VRILLE/PDP1 ϵ , reduzindo ou aumentando os níveis de PDP1 ϵ tem pouco efeito sobre a transcrição de *Clk* ou no ciclo de Vriille. Assim, outro papel para PDP1 ϵ pode ser encontrado na regulação do comportamento locomotor circadiano (KO & TAKAHASHI, 2006; ARBLE et al., 2010; PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

Outro gene descoberto recentemente é o *clockwork orange* (*cwo*). O gene *cwo* é um repressor transcricional de determinados genes do ciclo circadiano, como *per*, *tim*, *vri* e *pdp1ε*, podendo atuar ainda como amplificador de ritmos comportamentais (PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011).

A dinâmica da fosforilação determina o acúmulo de PER funcional e, portanto, a duração do período do ritmo circadiano (SHAFER et al., 2002; HAUS & SMOLENSKY, 2006). Descobertas tem contribuído para o papel clínico da quinase que fosforila Per (CHEN et al., 2005; GERY et al., 2006; SIEPKA et al., 2007; XU et al., 2007). A conservação desta função foi estabelecida quando um gene mutante em hamster já descrito, *tau*^{short-period}, foi clonado e encontrada uma mutação no gene da caseína quinase (PESCHEL & HELFRICH-FÖRSTER, 2011). Um defeito na fosforilação de PER implica no distúrbio do sono humano herdado (GARAULET & MADRID, 2011). Investigações mais aprofundadas dos mecanismos moleculares podem conduzir a uma melhor compreensão de como os genes do relógio circadiano interagem com as condições ambientais em invertebrados e vertebrados, inclusive no homem (GROTEWIEL et al., 2005; HAUS & SMOLENSKY, 2006; KONDRATOV, 2007; KRUGLUGER et al., 2007; LAPOSKY et al., 2008; LAPOSKY & TUREK, 2009; ARBLE et al., 2010).

2.3. Localização gênica em cromossomos por Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é uma reação que se dá entre uma sequência de DNA e uma sequência de DNA que lhe é complementar, visando verificar se a célula possui essa sequência e a sua exata localização. Essa técnica possibilitou ampliar os conhecimentos citogenéticos, unindo a aplicação de técnicas moleculares e citogenéticas, estabelecendo uma ligação entre análises genômica e citológica (LARA, 2002; GUERRA, 2004; RIEGER et al., 2006). A hibridização *in situ* começou a ser usada em procariotos, e atualmente sua aplicação revolucionou a compreensão da estrutura, função e evolução dos genes (LARA, 2002).

Citologicamente, a hibridização *in situ* foi primeiramente descrita por PARDUE & GALL, (1969a) e independentemente por JOHN et al., (1969).

Usando cromossomos da glândula salivar de *Drosophila*, regiões 5S, 18S e 28S foram hibridizadas e detectadas utilizando emulsão fotográfica, e mapeadas no cromossomo II. Mais tarde PARDUE & GALL, 1969b, localizaram regiões de DNA satélite, utilizando sondas oriundas de camundongo (*Mus musculus*), em cromossomos metafásicos de rato (*Rattus rattus*) e mostrou que a maioria das seqüências repetitivas no rato existem nas regiões pericentroméricas. A tecnologia de hibridização neste tempo era muito limitada já que técnicas como a de clonagem molecular não existiam ainda (SWIGER et al., 1995).

PETITPIERRE (1996) analisou o impacto das técnicas citogenéticas em insetos, levando em consideração seus papéis na taxonomia e para um melhor conhecimento da estrutura cromossômica. Foi dada especial ênfase à citogenética molecular pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), localização de regiões ricas em AT ou GC com fluorocromos e geração de bandas apartir de endonucleases de restrição em cromossomos de besouro. Alguns outros temas de interesse para citogenética de insetos, como a associação meiótica dos cromossomos sexuais, regiões organizadoras de nucléolos (RONs), e a constituição molecular dos telômeros, também foram discutidas levando em consideração os pontos de vista taxonomicos e estrutural. WOLF (1996) revisou a estrutura cromossômica de insetos em mitose e meiose, levantando a possibilidade que nucléolos de insetos têm uma arquitetura específica, e evidências de que acetilação de histonas H4 desempenha um papel na compensação de dose e que são um marcador citogenético de heterocromatina constitutiva em insetos.

SAHARA et al. (1999) observaram a ocorrência de repetições telôméricas TTAGG por hibridização *in situ* fluorescente e Hibridização Southern em dez espécies de insetos e dois outros artrópodes. Os autores sugeriram que tais repetições era um motivo filogeneticamente ancestral dos telômeros na linhagem de insetos, mas foi perdida de forma independente em diferentes grupos, sendo substituído por outros motivos. Em Coleoptera isso deve ter acontecido recentemente, e até mesmo membros da mesma família, Curculionidae, diferem em relação ao DNA telomérico.

Em dípteros, podem-se encontrar inúmeros estudos com relação à localização gênica, de seqüências únicas ou repetitivas, em cromossomos politênicos e análises evolutivas nas espécies do gênero *Drosophila* (DEMAKOV et al., 2001; DENG et al., 2005; DROSOPOULOU et al., 1996; EVGEN´EV et al., 2004; RANZ e cols., 2001; VIEIRA et al., 1997; ZIMIN et al., 2004.) e *Zaprionus* (CAMPOS et al., 2007). Recentemente o “*Drosophila 12 genomes consortium*” utilizou a técnica de hibridização *in situ* permanente para correlacionar genes cópia única e seqüências do arcabouço cromossômico de *D. melanogaster* com outras 11 espécies fazendo um amplo estudo evolutivo, obtendo inferências importantes para a filogenia do grupo (CLARK et al., 2007, SCHAEFFER et al., 2008).

Nos Coleoptera, a FISH vem sendo utilizada no que diz respeito à caracterização e comparação cariotípica. MOURA et al., (2003) analisou os cromossomos meióticos de *Phyllophaga* (*Phytalus*) *vestita*, *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff capillata* e *Lyogenys fuscus* (Melolonthinae) por coloração convencional, bandeamento C, fluorocromos, impregnação por nitrato de prata e FISH. Cromossomos meióticos e mitóticos de *Isocopris inhiata* e *Diabroctis mimas* foram estudados por BIONE et al., (2005) por meio de processos de coloração padrão, bandeamento C, inpregnação com nitrato de prata e FISH usando fragmento do gene 28S rDNA de *Apis mellifera* como sonda. COLOMBA et al., (2000) estudou o complemento cromossômico do escaravelho *Dorcus parallelipipedus* L. (Lucanidae) usando coloração convencional com Giemsa, bandeamento e hibridização *in situ* fluorescente ribossomal (FISH rDNA). FISH rDNA se mostrou uma ferramenta para fornecer uma identificação clara das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), quando os métodos convencionais de geração de bandas, mostrou-se inadequados para este caso.

Em gafanhotos, a hibridização *in situ* fluorescente vem sendo aplicada para caracterização cromossômica através da identificação de regiões altamente repetitivas do DNA, como as regiões organizadoras de nucléolos, regiões teloméricas e diferentes classes de DNA satélite e regiões gênicas de RNA ribossomal 5S e 18S e histona H3 (SOUZA & PEREIRA, 2000;

CABRERO et al., 2003; SOUZA et al., 2003; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; 2011b).

CABRERO et al., (2003) analisaram as implicações evolutivas da localização cromossômica de um fragmento de 180 pb de DNA satélite isolado do genoma de espécimes de *Eyprepocnemis plorans* espanhóis em cinco outras espécies de Eyprepocnemidinae coletadas na Rússia e na Ásia Central.

A localização cromossômica de famílias multigênicas (18S rDNA, 5S rDNA e histona H3) em quatro espécies de Proscopiidae foi verificada por CABRAL-DE-MELLO et al., (2011a). Os genes para 5S rDNA e histona H3 apresentaram uma considerável conservação em relação ao número de sítios e localização cromossômica, enquanto 18S rDNA mostrou uma ligeira variação em relação a localização cromossômica, dependendo da espécie.

Cromossomos de *Ommexecha virens* e *Descampsacris serrulatum* (Ommexechidae) foram analisados por CARVALHO et al, (2011) através da coloração convencional, bandeamento C, fluorocromos base específica, impregnação por nitrato de prata, e hibridização in situ fluorescente (FISH) com sonda para 45S rDNA. Este trabalho apresenta os primeiros dados cromossômicos, obtidos através de técnicas citogenéticas em Ommexechidae, contribuindo para uma melhor caracterização da evolução cariotípica desta família.

Na espécie *Eyprepocnemis plorans* foi utilizada a técnica de duplo-FISH a fim de se verificar a origem do cromossomo B nesta espécie (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994) e em *Podisma kanoi*, através de análises de FISH e seqüenciamento de regiões repetitivas do DNA de cromossomos B foi possível identificar o conteúdo gênico predominante desses cromossomos, bem como a origem dos mesmos em espécies de *Podisma* (BUGROV et al., 2007).

As espécies *Orthoscapheus rufipes* e *Eujivarus fusiformis* foram analisadas utilizando diversas técnicas de citogenética, como a impregnação por nitrato de prata e FISH por ROCHA et al., (2011). Foi verificado que os sítios de rDNA revelados por FISH coincidiu com o número e posição das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) ativas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Relizar estudos citogenéticos e evolutivos pela localização de gene de cópia única em gafanhotos de famílias da superfamília Acridoidea por intermédio da técnica de hibridização *in situ* permanente (PISH).

3.2. Objetivos específicos

1. Mapear por hibridização *in situ* o gene de cópia única *Period* em cromossomos meióticos de *Ommexecha virens* (Ommexechidae), *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* (Romaleidae) e *Schistocerca pallens* (Acrididae).
2. Comparar os resultados obtidos com os encontrados acerca da localização de genes de choque térmico (*Hsps*)
3. Buscar fazer inferências evolutivas a partir dos dados obtidos e da comparação com a literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de espécimes

O número de espécimes, locais de coleta e coordenadas, das espécies utilizadas neste trabalho são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Número de espécimes de *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* e *Schistocerca pallens* utilizados neste trabalho coletados em Pernambuco (PE), Piauí (PI) e Bahia (BA), estados do nordeste do Brasil e suas respectivas coordenadas geográficas.

Espécie	Nº de espécimes	Nº de registro*	Localização	Coordenadas geográficas
<i>O. virens</i>	2	8747; 8794	Sobradinho, BA	09°26'15"S, 40°48'45"W
	3	8023; 8025; 8056	Mucugê, BA	13°03'45"S, 41°18'45"W
<i>X. d. angulatus</i>	2	3217; 3221	Marcolândia, PI	7°26'15"S, 40°41'15"W
	1	3224	Exu, PE	7° 30' 50" S, 39° 42' 33"W
<i>T. collaris</i>	3	0001; 0002; 0003	Recife, PE	8°01'05", 34°56'48"W
	1	7093	Andaraí, BA	12°48'45"S, 41°18'45"W
<i>S. pallens</i>	4	6399; 6400; 6401; 6412	Itamaracá, PE	7°41'15"S, 34°48'45"W

* Os números de registro se encontram catalogados em livros de coletas, depositado no Laboratório de Genética e Citogenética Animal (LGCA) e no Laboratório de Experimentação em *Drosophila* (LED); Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

4.2. Dissecção de gafanhotos

O animal é anestesiado usando um chumaço de algodão embebido com éter ou clorofórmio. Posteriormente ele é dissecado, com ajuda de um estereomicroscópio, onde é feito um corte longitudinal na parte ventro-lateral do abdômen, expondo assim os testículos. Estes são retirados e colocados numa placa contendo 1,5 ml de fixador (etanol-ácido acético, 3:1), e depois de fixados são estocados a -20°C.

4.3. Preparação das lâminas

As lâminas foram preparadas por meio da técnica clássica de esmagamento folicular (**Figura 8; A**). Para cada lâmina foi utilizado um único folículo testicular. A fixação do material foi realizada com ácido acético a 45% e quando necessário os cromossomos foram corados com orceína 1%. O material fixado sobre a lâmina sofreu congelamento em nitrogênio líquido por alguns minutos e logo após a lâmina foi retirada. A lâmina foi armazenada à 8°C e, posteriormente, selecionada em microscópio para hibridização *in situ*.

4.4. Amplificação e marcação dos plasmídios

Os plasmídios com o gene *Period* (*Per*) clonados do genoma da mosca-do-figo *Zaprionus indianus* (Díptera, Drosophilidae), foram amplificados na bactéria *Escherichia coli*, (**Figura 8; B**), cultivada em meio LB com o antibiótico ampicilina (100 µg/ml), seguido por extração em larga escala por lise alcalina (AUSUBEL et al., 2002). Para a utilização como sonda, o DNA foi marcado com biotina (**Figura 8; D**) utilizando o kit BioNick DNA (GIBCO/ BRL, Paisley, Escócia).

4.5. Hibridização *in situ*

A preparação do material cromossômico, desnaturação, condições de hibridização e revelação (**Figura 8; C, E, F e G**) foram realizadas conforme descrito em RIEGER et al. (2007). Desta maneira, as lâminas com cromossomos foram desnaturadas com NaOH 4% diluído em Etanol (100%) e submetido a lavagens estringentes, com 2X SSC a temperatura ambiente. A hibridização *in situ* foi realizada em tampão contendo formamida a 30% a 36°C por 40 horas, usando 100ng de sonda marcada para cada lâmina, adotando-se, portanto, nível de estringência de 65%, aproximadamente (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 2000). A revelação utilizou estreptoavidina/ fosfatase alcalina (SAP), azul de nitrato tetrazólio (NBT) e 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato (BCIP). As lâminas foram contra-coradas com uma solução de orceína lacto-acética 1% diluída 1:10 em ácido acético 45% e água destilada, e

posteriormente montadas com Entellan (Merck). Para o mapeamento cromossômico do gene *Per*, foram hibridizadas cinco lâminas de cada espécie.

4.6. Análise microscópica

As lâminas hibridizadas foram analisadas ao microscópio óptico sob contraste de fase (**Figura 8; H**). Apenas os núcleos em fases com os cromossomos identificáveis foram quantificados. Os cromossomos marcados por hibridização *in situ* e os núcleos mais apresentáveis das lâminas foram fotografados com câmera digital Leica DFC 340FX acoplada ao Fotomicroscópio Leica com a objetiva de 100X e as imagens geradas apartir do software Leica IM50.

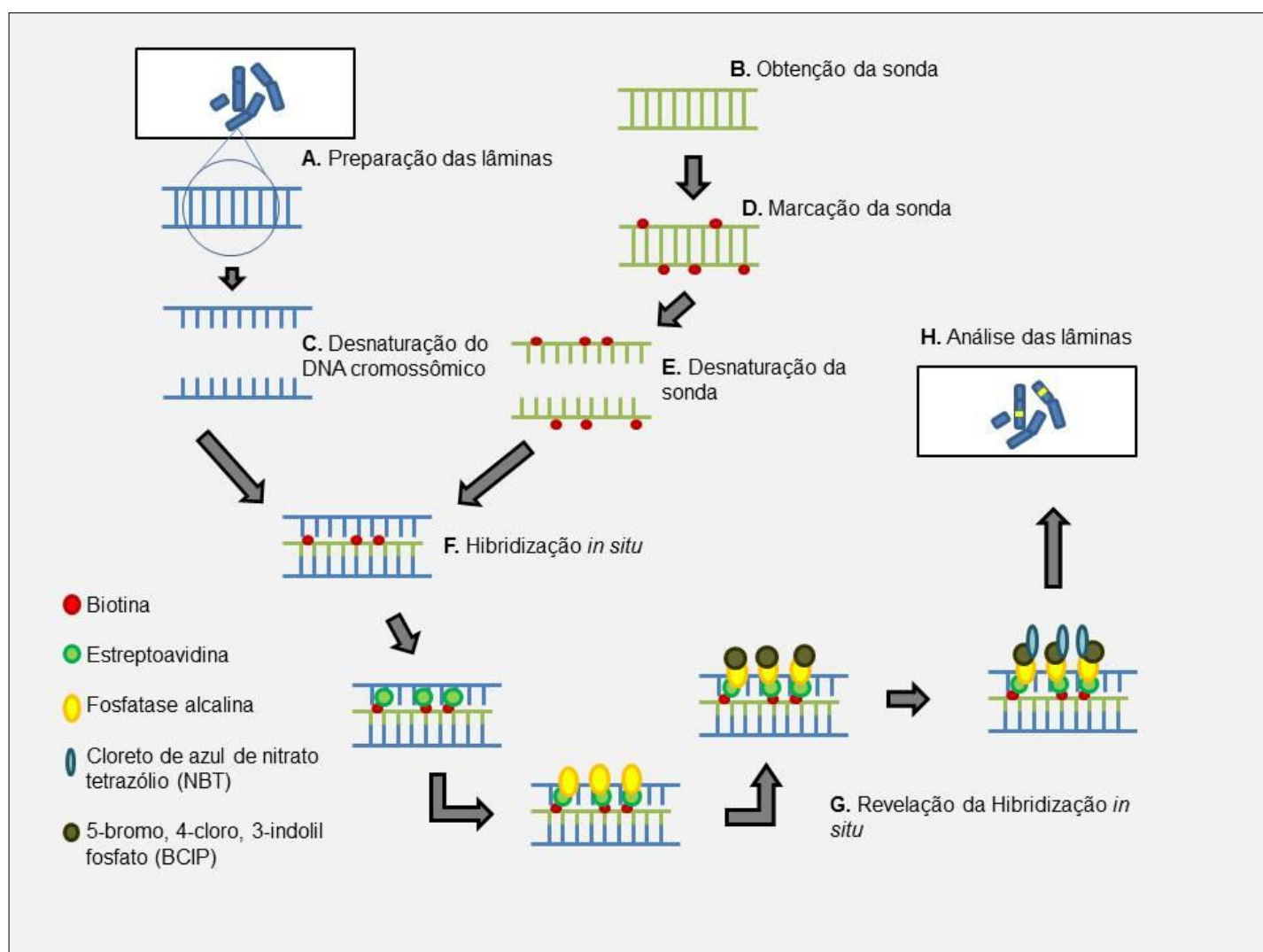


Figura 8. Principais etapas da Hibridização *in situ* permanente (PISH). Adaptado de GUERRA, 2004.

5. RESULTADOS

Por intermédio da técnica de hibridização *in situ* permanente (PISH) foi possível localizar o gene de cópia única *Per* em cromossomos meióticos de *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* e *Schistocerca pallens*. Para a caracterização cromossômica, pela técnica de PISH, foram analisados 169 núcleos com uma frequência de 62,27% de marcação em *O. virens*. Para *T. collaris*, foram observados 164 núcleos com frequência de 62,80% de marcação. Em *X. d. angulatus* foram analisados 250 núcleos com frequência de 53,60% de marcação. *S. pallens* foram observados 100 núcleos com frequência de 56,00% de marcação (**Tabela 2**).

Foram selecionadas cinco lâminas de três indivíduos de *O. virens* para a análise das marcações da hibridização do gene *Per* e no total de 169 núcleos, foi observado marcações em 112 núcleos onde duas regiões foram mapeadas nos par autossômico **G₁** com 48,21% de frequência (**Figura 9**). Menores frequências de marcações foram observadas em outros cromossomos: **G₂** (11,61%), **G₃** (13,39%), **M₄** (27,68%), **P₉**, bem como no cromossomo **X** (4,64%).

Em cinco lâminas de três indivíduos de *X. d. angulatus* foram analisados 250 núcleos tendo sido observadas marcações consistentes do gene *Per* em 134 núcleos, onde uma região foi mapeada no par autossômico **G₁**, com 45,52% de frequência (**Figura 10**). Menores frequências de marcações foram observadas em outros cromossomos: **G₂** (18,66%), **G₃** (13,43%); **M₄** (8,95%); **M₅** (10,45%); **P₉** e **P₁₀** (5,22%) e **X** (10,45%).

Em cinco lâminas de quatro indivíduos de *T. collaris* foram analisados 164 núcleos tendo sido observadas marcações consistentes do gene *Per* em 103 núcleos, onde uma região foi mapeada no par autossômico **G₁**, com 51,45% de frequência (**Figura 12**). Menores frequências de marcações foram observadas em outros cromossomos: **G₂** (12,62%), **M₃** (14,53%), **M₅** (10,68%) e **M₄**, **P₉** e **X** (8,73%).

Em cinco lâminas de dois indivíduos de *S. pallens* foram analisados 100 núcleos tendo sido observadas marcações consistentes do gene *Per* em 56 núcleos, onde uma região foi mapeada no par autossômico **G₁**, com 39,28%

de frequência (**Figura 11**). Menores frequências de marcações foram observadas em outros cromossomos: **G₂** (12,50%), **G₃** (12,50%); **M₄** (3,57%); **M₈** (23,21%); **P₉** (5,36%) e **X** (5,36%).

Tabela 2. Frequência absoluta de marcação do gene *Period* nos autossomos e cromossomo X das espécies *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* e *Schistocerca pallens*.

Gene <i>Period</i>			Frequência absoluta de marcação nos autossomos e cromossomo X												
Espécie	Núcleos analisados	Núcleos marcados	G1	G2	G3	M3	M4	M5	M6	M7	M8	P9	P10	P11	X
<i>O. virens</i>	169	112	54	13	15	-	31	-	-	-	-	5	-	-	5
<i>X.d. angulatus</i>	250	134	61	25	18	-	12	15	-	-	-	7	7	-	14
<i>T. collaris</i>	164	103	53	13	-	9	11	-	-	-	-	9	-	-	9
<i>S. pallens</i>	100	56	22	7	7	-	2	-	-	-	13	3	-	-	3

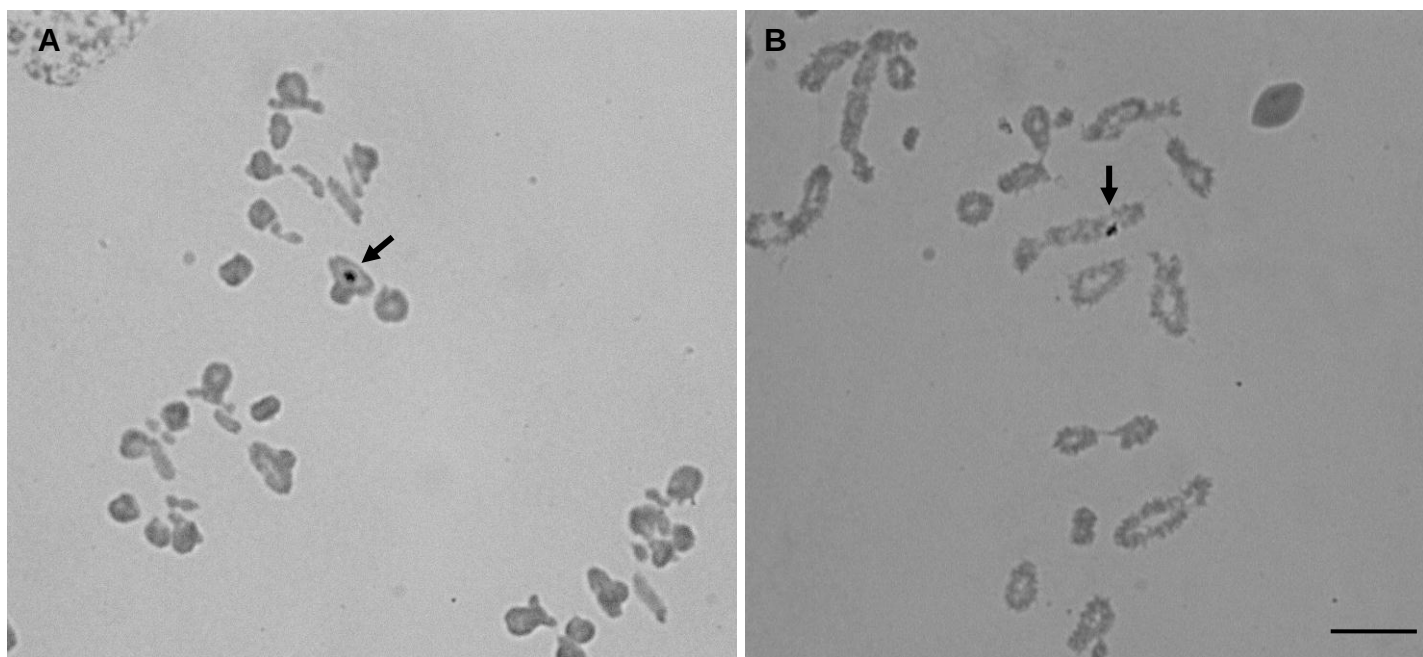


Figura 9. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Ommexecha virens*. **A**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo G_1 ; **B**, Diplóteno apresentando marcação no cromossomo G_1 . Barra= 10 μ m.

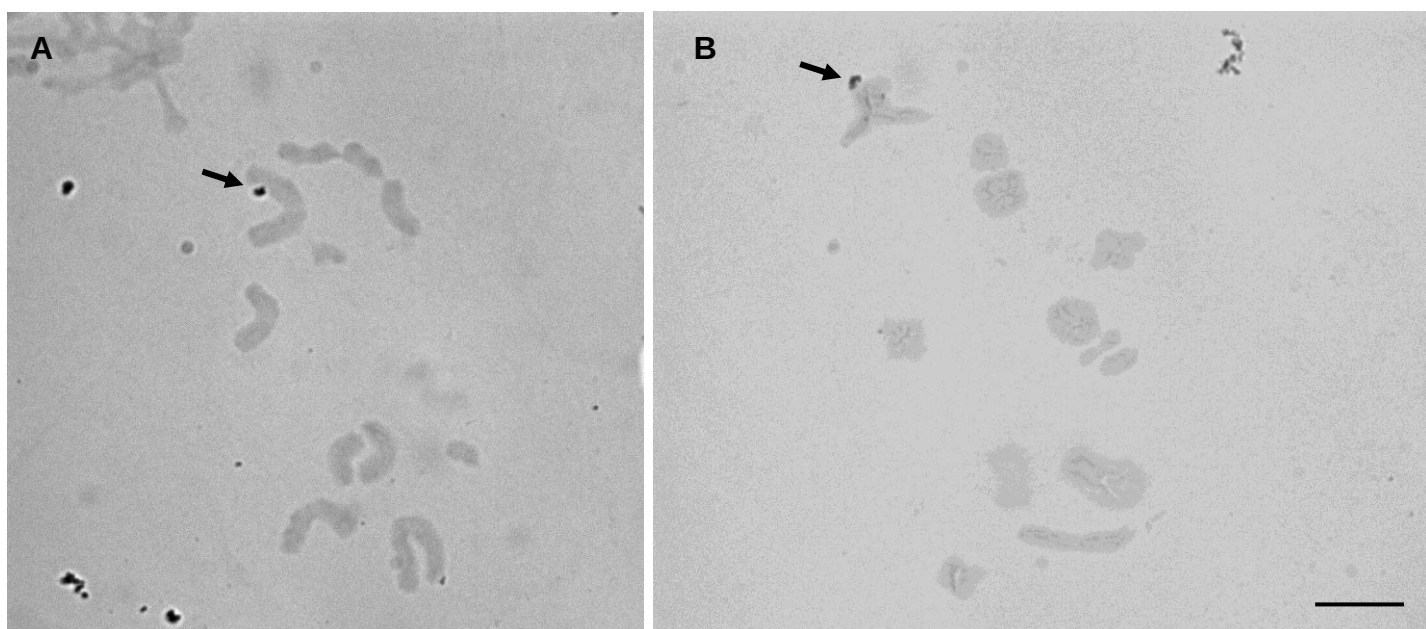


Figura 10. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Xyleus discoideus angulatus*. **A**, Anáfase apresentando marcação no cromossomo G_1 ; **B**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo G_1 . Barra= 10 μ m.

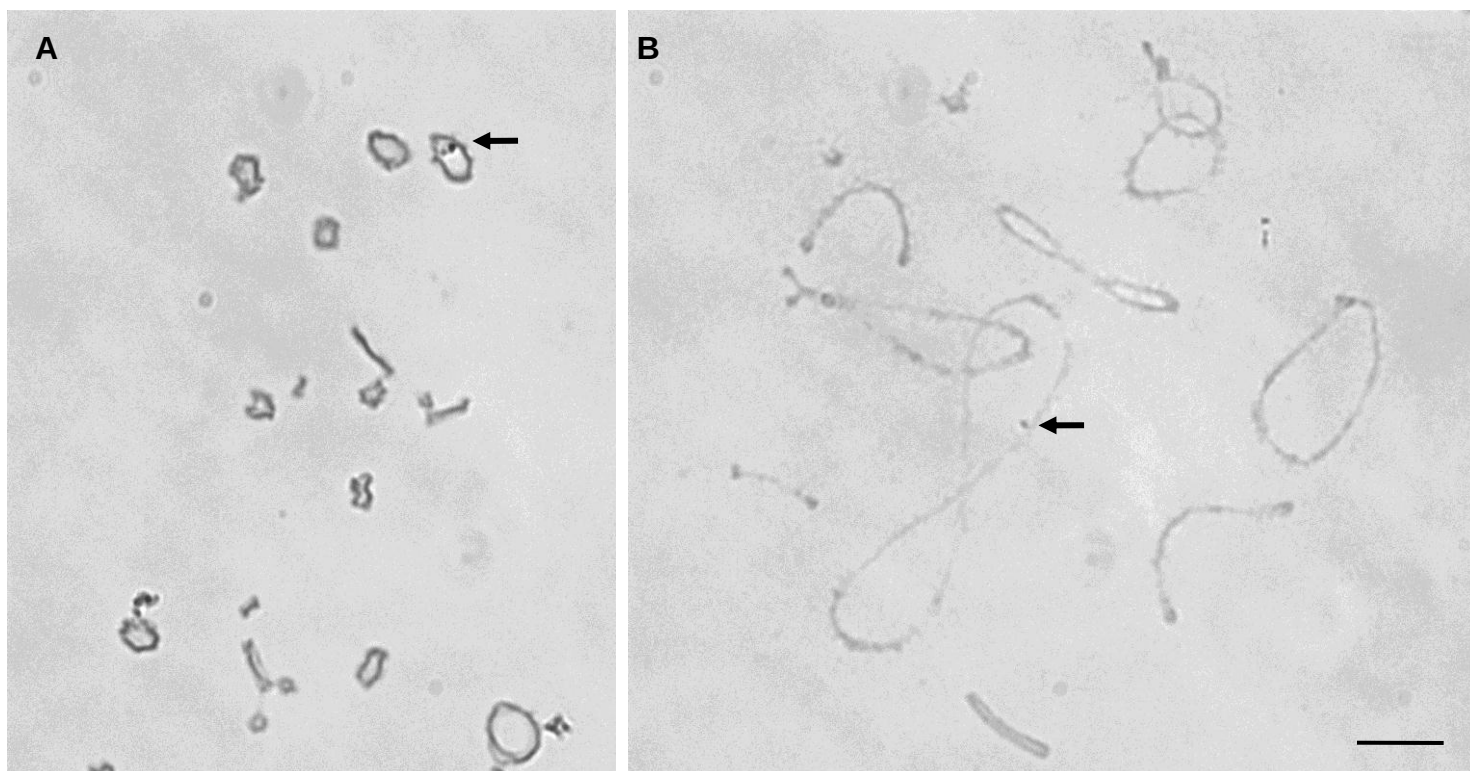


Figura 11. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Schistocerca pallens*. **A**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo G_1 ; **B**, Diplóteno apresentando marcação no cromossomo G_1 . Barra= 10 μ m.

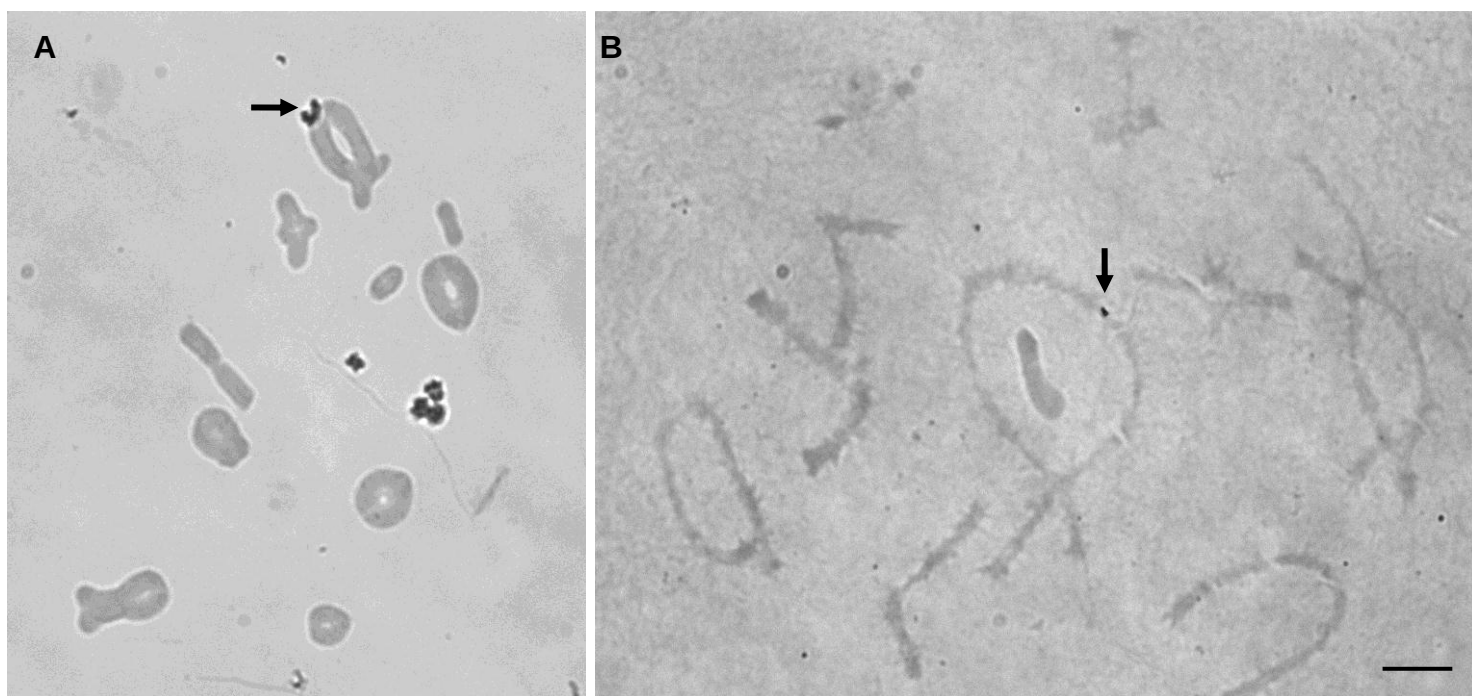


Figura 12. Marcas de hibridização do gene *Per* em cromossomos meióticos de *Tropidacris collaris*. **A**, Metáfase apresentando marcação no cromossomo G_1 ; **B**, Diplóteno apresentando marcação no cromossomo G_1 . Barra= 10 μ m.

6. DISCUSSÃO

Uma das formas de se observar evolução cariotípica em gafanhotos é através de marcadores como genes de cópia única. Este tipo de identificação já foi realizado em cromossomos politênicos de drosofilídeos como *Drosophila melanogaster* (IZQUIERDO, 1994; VIEIRA et al., 1997; RANZ et al., 2001; EVGEN'EV et al., 2004) e *Zaprionus indianus* (CAMPOS et al., 2007). A localização de genes de cópia única pode ser útil na comparação de cariótipos de espécies de gêneros próximos, como o realizado por CLARK et al., (2007), no gênero *Drosophila*, ou até mesmo para realizar uma comparação cariotípica entre gafanhotos de espécies e famílias diferentes. Em gafanhotos, utilizando sondas heterólogas RIEGER et al., (2007), definiram que 30% é a frequência mínima para que as marcações sejam consideradas consistentes.

São inexistentes trabalhos acerca da localização do gene *Per* em insetos, especialmente nos Orthoptera. A maioria dos trabalhos sobre este gene tratam-se da caracterização molecular das regiões repetitivas Thr-Gly em alguns grupos, como Díptera e Lepidoptera; da utilização deste gene como marcador em estudos filogeográficos, sistemática molecular e evolução do gene. Estes artigos demonstram o considerável nível de conservação e viabilidade da utilização deste gene, unicamente ou em associação à outros marcadores, para uso em sistemática e na resolução de problemas taxonômicos e de estudos populacionais nesses grupos de insetos citados (THACKERAY & KYRIACOU, 1990; NIELSEN et al., 1994; ROSATO et al., 1996; REGIER et al., 1998; XIANG-ZHONG et al., 1999; MAZZONI et al., 2002; MIYATAKE et al., 2002; ROSATO & KYRIACOU, 2004; TAUBER et al., 2004; BARR et al., 2005; MAZZOTTA et al., 2005; LANKINEN & FORSMAN, 2006; SAWYER et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2008).

MONTE (2010)^{***} e SILVA (2010)^{****} localizaram o gene *Per* em *Drosophila willistoni* e *Zaprionus indianus*, respectivamente, e como em *Drosophila melanogaster*, este gene se localiza no cromossomo X (HARDIN & SIWICKI, 1995). Em *D. willistoni* o gene *per* apresenta uma segunda cópia no cromossomo III. MONTE (2010) utilizando o gene *Period* como marcador propôs uma filogenia bastante próxima à proposta por CLARK et al, 2007; exceto que o primeiro se utilizou de um número menor de espécies e que a

análise considera *D. mojavensis* mais aparentada à *D. grimshawi*. Tais dados demonstram uma provável conservação da localização do gene *Per* em Díptera. Comparando estes dados com os da localização deste gene nas espécies de gafanhotos citadas neste trabalho (**Tabela 3**), é possível supor que em Orthoptera o gene *Period* apresente uma conservação no que diz respeito a sua localização, neste caso, no maior par autossômico (**G₁**). Seria fundamental fazer-se a caracterização molecular deste gene nas espécies aqui estudadas e em outras espécies de Orthoptera a fim de verificar-se se esta conservação não se limita apenas à localização deste gene, mas se ela também ocorre na natureza molecular deste gene, como visto em Lepidoptera (REGIER et al., 1998).

Tabela 3. Mapeamento por hibridização *in situ* de genes de cópia única e repetitiva em cromossomos meióticos das espécies *Ommexecha virens* (Ommexechidae), *Tropidacris collaris*, *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae) e *Schistocerca pallens* (Acrididae).

GENE	<i>Hsp83</i> ¹	<i>Hsp70</i> ¹	<i>Hsp27</i> ¹	<i>Ubi</i> ¹	<i>Per</i> ²	<i>45S rDNA</i>
<i>Ommexecha virens</i> (Ommexechidae)	G ₁ , M ₄	G ₂ , M ₄	G ₁	G ₂ , M ₄	G ₁	G ₂ , P ₉ , P ₁₀ ,
<i>Xyleus discoideus angulatus</i> (Romaleidae)	G ₁	G ₂ , M ₈	G ₁	G ₂ , M ₄	G ₁	G ₃ , M ₄ , X
<i>Tropidacris collaris</i> (Romaleidae)	G ₁ , M ₃	G ₂ , M ₄	G ₁	G ₁ , M ₃	G ₁	-
<i>Schistocerca pallens</i> [¶] (Acrididae)	M ₇	G ₂	G ₁ , M ₄	G ₂	G ₁	M ₅ , M ₆

¹Fonte: DE SOUZA, 2008. ²Presente Trabalho. [¶]RIEGER et al., 2007.

Comparando-se a localização cromossômica do gene *Period*, genes de resposta à choque térmico (*Hsps* e *Ubi*) e de DNA ribossomal (*45S rDNA*) nas espécies aqui estudadas é observado uma certa conservação da posição dos genes de cópia única (*Per*, *Hsps* e *Ubi*) nos cromossomos grandes (**G₁** e **G₂**, principalmente) e uma constância na localização de gene de cópia repetitiva (*45S rDNA*) nos pares cromossômicos médios e pequenos, como visto em *X. d. angulatus* (**M₄**, **X** e no menor dos pares grandes, **G₃**); em *S. pallens*, nos pares **M₅** e **M₆** e em *O. virens*, nos pares **P₉** e **P₁₀**, embora exista uma cópia no par **G₂** (SOUZA et al., 1998; SOUZA & MELO, 2007; CARVALHO et al., 2011). Em outras espécies de gafanhotos, observa-se a localização de *45S rDNA* nos

pares médios também, assim visto em *Chromacris speciosa* e *C. nuptialis*, no par **M₆** e em *Xestotrachelus robustus*, no par **M₅** (LORETO et al., 2005). CABRAL-DE-MELLO et al., (2011b) analisaram a localização cromossômica de sítios de rDNA 5S em 29 espécies de gafanhotos pertencentes à família Acrididae e foi visto que, além do número de sítios por espécies variar de um único par cromossômico (em seis espécies) para todos os pares de cromossomos (em cinco espécies), com uma gama de situações intermediárias, foi observado uma ligeira concentração desses sítios nos cromossomos médios e pequenos. É possível supor que durante a separação dessas espécies, a localização dos genes de cópia única tenha sido mantida nos cromossomos grandes e, no entanto, a dos genes de cópia repetitiva tenha sido espalhada nos cromossomos médios e pequenos.

O mapeamento do gene *Per* sugere a ocorrência de homologia do cromossomo **G₁** entre representantes das famílias Ommexechidae, Acrididae e Romaleidae, que apresentam proximidade taxômica (CARBONELL, 1977; EADES, 2000; SONG, 2010). Mostra também que a erosão gênica possivelmente não seja tão grande entre as espécies de gafanhotos de famílias diferentes, sugerindo a ocorrência de algum grau de sintenia gênica entre os diferentes grupos.

O método de PISH pode ser facilmente aplicado a cromossomos mitóticos e meióticos de insetos e de outros organismos, gerando marcadores adicionais para além dos de técnicas de citogenética convencional. As marcas cromossômicas estabelecidos neste estudo serão úteis como marcadores físicos para orientar um programa de seqüenciamento do genoma das espécies descritas neste trabalho. Isto pode ampliar as possibilidades de comparar o conteúdo genético de cariótipos semelhantes de diversas espécies e, provavelmente expandir o conhecimento sobre evolução das espécies para as quais todo o seqüenciamento do genoma é ainda uma escolha de custo proibitivo.

**DE SOUZA. Hibridização *in situ* de genes de resposta a estresse nos gafanhotos *Ommexecha virens* (Ommexechidae) e *Tropidacris collaris* (Romaleidae) Recife, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2008.

***MONTE, E.S. Gene *Period*: análise da assinatura seletiva e mapeamento em *Drosophila willistoni*. Recife, Departamento de biologia, UFRPE, 2010.

****SILVA, A.N. Caracterização Genômica de *Zaprionus Indianus* (Diptera, Drosophilidae) por mapeamento gênico. Recife, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2010.

7. CONCLUSÕES

1. Em *Ommexecha virens*, *Xyleus discoideus angulatus*, *Tropidacris collaris* e *Schistocerca pallens* e o gene *Period* está localizado no par cromossômico **G₁**.
2. Juntamente com os dados de literatura estes resultados indicam a existência de uma considerável homologia cromossômica do par **G₁** entre as famílias Ommexechidae, Acrididae e Romaleidae.
3. Os resultados apontam para conservação molecular do gene *Period* em Orthoptera como um possível reflexo da conservação na localização cromossômica, da mesma forma que ocorre em Díptera e Lepdoptera.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMÉDÉGNATO, C. Les genres d'acridiens neotropicaux, leur classification par familles, sous-familles et tribus. **Acrida**, 3: 193–203, 1974.
- ARBLE, D.M.; RAMSEY, K.M.; BASS, J.; TUREK, F.W.; Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, 24(5): 785-800, 2010.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**, 1512 pages, 2 Vol, John Wiley and Sons, 2002.
- BAE K.; LEE, C.; SIDOTE, D.; CHUANG, K.Y.; EDERY, I. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. **Molecular and Cellular Biology**, 18(10): 6142-6151, 1998
- BARR, N.B.; CUI, L.; MCPHERON, B.A. Molecular Systematics of Nuclear Gene *period* in Genus *Anastrepha* (Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, 98(2): 173-180, 2005.
- BARRIENTOS, L.L. Final report of mission on integrated locust/ grasshopper control in Brasil (states of Paraíba, Rio Grande do Norte, Mato Grosso and Rio Grande do Sul). **FAO**, Rome, Italy. Unpublished, 15 p., 1992.
- BARRIENTOS, L.L. The present state of the locust and grasshopper problem in Brazil. **Journal of Orthoptera Research**, 4: 61-64, 1995.
- BENSASSON, D.; PETROV, D.A.; ZHANG, D.X.; HARTL, D.L.; HEWITT, G.M. Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers. **Molecular Biology and Evolution**, 18: 246–253, 2001a.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D.X.; HARTL, D.L.; HEWITT, G.M.; Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology and Evolution**, 16: 314–321, 2001b.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. **Molecular Biology and Evolution**, 17: 406–415, 2000.
- BIONE, E.; CAMPAROTO, M.L.; SIMÕES, Z.L.P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. **Genetics and Molecular Biology**, 28(1): 111-116, 2005.
- BUZZI, Z.J. Entomologia didática. 4ª ed., Curitiba, **Editora UFPR**, 347 p., 2005.

- BUGROV, A.G.; KARAMYSHEVA, T.V.; PEREPELOV, E.A.; ELISAPHENKO, E.A.; RUBTSOV, D.N.; WARCHAOWSKA-ŚLIWA, E.; TATSUTA, H.; RUBTSOV, N.B. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera; Acrididae). **Chromosome Research**, 15: 315-325, 2007.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; SOUZA, M.J.; MOURA, R.C. 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: 89–93, 2011a.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P.M. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. **Genetica**, 139: 921–931, 2011b.
- CABRERO, J.; BUGROV, A.; WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; LÓPEZ-LEÓN, MD.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. **Heredity**, 90: 377–381, 2003.
- CAMPOS, S.R.C.; RIEGER, T.T.; SANTOS, J.F. Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Zaprionus indianus*. **Genet Mol Res**, 6(2): 262-276, 2007.
- CARBONELL, C.S. Origin, evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): A preliminary hypothesis. **Rev Soc Ent Argentina**, 36(1-4): 153-175, 1977.
- CARBONELL, C.S. Revision of the neotropical genus *Tropidacris* (Orthoptera; Acridoidea; Romaleidae; Romaleinae). **Proc Acad Nat Sci Phil**, 138(2): 366-402, 1986.
- CARBONELL, C.S. The genus *Xyleus* Gistel 1848 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). **Journal of Orthoptera Research**, 13(1): 63-133, 2004.
- CARVALHO, D.B.; ROCHA, M.F.; LORETO, V.; SILVA, A.E.B.; SOUZA, M.J. *Ommexecha virens* (Thunberg, 1824) and *Descampsacris serrulatum* (Serville, 1831) (Orthoptera, Ommexechidae): karyotypes, constitutive heterochromatin and nucleolar organizing regions. **Comp Cytogen**, 5(2): 123–132, 2011.
- CHEN, S.T.; CHOO, K.B.; HOU, M.F.; YEH, K.T.; KUO, S.J.; CHANG, J.G. Deregulated expression of the *PER1*, *PER2* and *PER3* genes in breast cancers. **Carcinogenesis**, 26(7): 1241-1246, 2005.
- CHILOV, D.; HOFER, T.; BAUER, C.; WENGER, R.H.; GASSMANN, M. Hypoxia affects expression of circadian genes *PER1* and *CLOCK* in mouse brain. **FASEB Journal**, 15(14): 2613-2622, 2001.

- CLARK, A.G.; EISEN, M.B.; SMITH, D.R.; et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. **Nature**, 450: 203-218, 2007.
- COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). **Hereditas**, 133: 249-253, 2000.
- DE LA IGLESIA, H.O.; MEYER, J.; SCHWARTZ, W.J. Using Per gene expression to search for photoperiodic oscillators in the hamster suprachiasmatic nucleus, **Molecular Brain Research**, 127 (1-2): 121-127, 2004.
- DEMAKOV, S.A.; GORCHAKOV, A.A.; SCHWARTZ, Y.B.; SEMESHIN V.F.; ZHIMULEV, I. F. Analysis of DNA Interband Regions 3A5/A6, 3C5-6/C7, and 60E8-9/E10 in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **Russian Journal of Genetics**, 37(11): 1247–1256, 2001.
- DENG, H.; ZHANG, W.; BAO, X.; MARTIN, J.N.; GIRTON J.; JOHANSEN, J.; JOHANSEN, K.M. The JIL-1 kinase regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. **Chromosoma**, 114: 173–182, 2005.
- DIRSH, V.M. "Classification of the acridomorphoid insects", Farrington, **Oxford**, Classey, 1974.
- DROSOPOULOU, E.; KONSTANTOPOULOU, I.; SCOURAS, Z.G. The heat shock genes in the *Drosophila montion* subgroup: chromosomal localization and evolutionary implications. **Chromosoma**, 105: 104-110, 1996.
- DUNLAP, J.C. Common threads in eukaryotic circadian systems. **Current Opinion in Genetics and Development**, 8(4): 400-406, 1998.
- DUNLAP, J.C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, 96: 271–290, 1999.
- DURATON, J.F.; LAUNOIS M.; LAUNOIS-LUONGM, H.; LECOQ, M. Guia prático de luta contra os gafanhotos devastadores no Brasil. **FAO**, Rome – CIRAd/ Pritas, Montpellier, 161p., 1987.
- EADES, D.C. Evolutionary relationships of phallic structures of Acridomorpha (Orthoptera). **Journal of Orthoptera Research**, 9: 181-210, 2000.
- EVGEN´EV, M.B.; ZATSEPINA, O.G.; GARBUZ, D.; LERNMAN, D. N.; VELIKODVORSKAYA, V.; ZELENTOVA, E.; FEDER, M.E. Evolution and arrangement of the *hsp70* gene cluster in two closely related species of virilis group of *Drosophila*. **Chromosoma**, 113: 223-232, 2004.
- FLOOK, P.K.; ROWELL, C.H.F. The phylogeny of the Caelifera (Insecta, Orthoptera) as deduced from mitochondrial rRNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8: 89-103, 1997a.

- FLOOK, P.K.; ROWELL, C.H.F. The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order, Orthoptera. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8: 177-192, 1997b.
- FLOOK, P.K.; ROWELL, C.H.F. Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal RNA sequences. **Insect Mol Biol**, 7: 163-178, 1998.
- FLOOK, P.K.; KLEE, S.; ROWELL, C.H.F. A combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera and its implications for their higher systematics. **Syst Biol**, 48: 233-253, 1999.
- FLOOK, P.K.; KLEE, S.; ROWELL, C.H.F. Molecular phylogenetic analysis of the basal Acridomorpha (Orthoptera, Caelifera): resolving morphological character conflicts with molecular data. **Mol Phyl Evol**, 15: 345-354, 2000.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI, F. E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. **FEALQ**, Piracicaba, Brasil, 920 p., 2002.
- GARAULET, M.; MADRID, J.A. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 62(9-10): 967-978, 2011.
- GELLISSEN, G.; BRADFIELD, J.Y.; WHITE, B.N.; WYATT, G.R.; Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. **Nature**, 301: 631–634, 1983.
- GERY, S.; KOMATSU, N.; BALDJYAN, L.; YU, A.; KOO, D.; KOEFFLER, H.P. The Circadian Gene *Per1* Plays an Important Role in Cell Growth and DNA Damage Control in Human Cancer Cells. **Molecular Cell**, 22(3): 375-382, 2006.
- GIEBULTOWICZ, J.M.; IVANCHENKO, M.; VOLLINTINE, T. Organization of the insect circadian system: Spatial and developmental expression of clock genes in peripheral tissues of *Drosophila melanogaster*, In: DENLINGER, D.L.; GIEBULTOWICZ, J.M.; SAUNDERS, D.S.; Editor(s) Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality, **Elsevier Science B.V.**, Amsterdam, pages 31-42, 2001.
- GROTEWIEL, M.S.; MARTIN, I.; BHANDARI, P.; COOK-WIENS, E. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. **Ageing Research Reviews**, 4: 372–397, 2005.
- GUERRA, M.; Fluorescent *in situ* hybridization, conceitos e aplicações em citogenética. ORG.: Marcelo Guerra. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 1-29, 2004.

- HALL, J.C. Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. **Current Opinion in Neurobiology**, 10(4): 456-466, 2000.
- HARDIN, P.E.; SIWICKI, K.K. The multiple roles of *per* in the *Drosophila* circadian clock. **Seminars in Neuroscience**, 7(1): 15-25, 1995.
- HARDIN P.E. Activating inhibitors and inhibiting activators: a day in the life of a fly. **Current Opinion in Neurobiology**, 8(5): 642-647, 1998.
- HARDIN, P.E. Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. **Journal of Biological Rhythms**, 19(5): 348-360, 2004.
- HAUS, E.; SMOLENSKY, M. (2006) Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. **Cancer Causes Control**, 17(4): 489-500, 2006.
- HENDRICKS, J.C. Invited review: Sleeping flies don't lie: the use of *Drosophila melanogaster* to study sleep and circadian rhythms. **Journal of applied Physiology**, 94(4): 1660-1672, 2003.
- HIRAYAMA, J.; FUKUDA, I.; ISHIKAWA, T.; KOBAYASHI, Y.; TODO, T. New role of zCRY and zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of zCLOCK and zBMAL proteins. **Nucleic Acids Research**, 31(3): 935-943, 2003a.
- HIRAYAMA, J.; NAKAMURA, H.; ISHIKAWA, T.; KOBAYASHI, Y.; TODO, T. Functional and structural analyses of cryptochrome. Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK: BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. **The Journal of Biological Chemistry**, 278(37): 35620-35628, 2003b.
- IMENES, S.L.; IDE, S. Principais grupos de insetos pragas em plantas de interesse econômico. Centro de pesquisa e desenvolvimento de sanidade vegetal, Instituto Biológico. **Biológico**, 64(2): 235-238. < www.Fides.org/index.php>, 2002.
- IVANCHENKO, M.; STANEWSKY, R.; GIEBULTOWICZ, J.M. Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. **Journal of Biological Rhythms**, 16(2): 205-215, 2001.
- IZQUIERDO, M. Ubiquitin genes and ubiquitin protein location in polytene chromosomes of *Drosophila*. **Chromosoma**, 103: 193-197, 1994.
- JOHN, H.; BIRNSTIEL, M.; JONES, K. RNA: DNA hybrids at the cytogenetical level. **Nature**, 223: 582-587, 1969.
- KEVAN, D.K.M. Orthoptera. Pp. 352–383. Synopsis and Classification of Living Organisms. **McGraw-Hill Book Company**, Inc, 1982.

- KO, C.H.; TAKAHASHI, J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human Molecular Genetics**, 15(2): 271-277, 2006.
- KOH, K.; ET AL. JETLAG Resets the *Drosophila* Circadian Clock by Promoting Light-Induced Degradation of TIMELESS. **Science**, 312: 1809-1815, 2006.
- KONDRATOV, R.V. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. **Ageing Research Reviews**, 6(1): 12-27, 2007.
- KONOPKA, R.J.; BENZER, S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Nat Acad Sci USA**, (68)9: 2112-2116, 1971.
- KONOPKA, R.J. Genetics of Biological Rhythms in *Drosophila*. **Annual Review in Genetics**, (21): 227-236, 1987.
- KNOWLES, A.; KOH, K.; JUNE-TAI, W.; CHENG-TING, C.; CHAMOVITZ, D.A.; BLAU, J. The COP9 Signalosome Is Required for Light-Dependent Timeless Degradation and *Drosophila* Clock Resetting. **The Journal of Neuroscience**, 29(4): 1152–1162, 2009.
- KRUGLUGER, W.; BRANDSTAETTER, A.; KÁLLAY, E.; SCHUELLER, J.; KREXNER, E.; KRIWANEK, S.; BONNER, E.; CROSS, H.S. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. **Cancer Research**, 67(16): 7917-7922, 2007.
- KYRIACOU, C.P.; HASTINGS, M. Keystone clocks. **Trends in Neuroscience**, 24(8): 434-435, 2001.
- LAKIN-THOMAS, P.L. Circadian rhythms: new functions for old clock genes. **Trends in Genetics**, 16(3): 135-142, 2000.
- LANKINEN, P.; FORSMAN, P. Independence of Genetic Geographical Variation between Photoperiodic Diapause, Circadian Eclosion Rhythm, and Thr-Gly Repeat Region of the *period* Gene in *Drosophila littoralis*. **Journal of Biological Rhythms**, 21: 3-12, 2006.
- LAPOSKY, A.D.; BASS, J.; KOHSAKA, A.; TUREK, F.W. Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism. **FEBS Letters**, 582(1): 142-151, 2008.
- LAPOSKY, A.D.; TUREK, F.W. Physiologic and Health Consequences of Circadian Disruption (in Animal Models). **Sleep Medicine Clinics**, (4)2: 127-142, 2009.
- LARA, F.J.S. Hibridização de ácidos nucléicos. **Holos editora**, Sociedade Brasileira de Genética, 2º ed. Ribeirão Preto, 65-80, 2002

- LEE, C.; BAE, K.; EDERY, I. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. **Molecular and Cellular Biology**, 19(8): 5316-5325, 1999.
- LIN, F.J.; SONG, W.; MEYER-BERNSTEIN, E.; NAIDOO, N.; SEHGAL, A. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. **Molecular and Cellular Biology**, 21(21): 7287-7294, 2001.
- LIU, J.; MALKANI, G.; SHI, X.; MEYER, M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MA, X.; SUN, Z.S. The circadian clock *Period2* gene regulates gamma interferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. **Infection and Immunity**, 74(8): 4750-4756, 2006.
- LOPEZ, J.V.; YUHKI, N.; MASUDA, R.; MODI, W.; O'BRIEN, S.J. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. **Journal of Molecular Evolution**, 39: 174-190, 1994.
- LÓPEZ-LEÓN, M.D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S.(PAT); HEWITT, G.M.; CAMACHO, J.P.M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, 2(2):87-92, 1994.
- LORETO, V.; STADTLER, E.; MELO, N.F.; SOUZA, M.J. 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.
- MARANHÃO, Z.C. Entomologia geral, **Nobel**, São Paulo, Brasil, 514 p., 1976.
- MATSUMOTO, A.; TOMIOKA, K.; CHIBA, Y.; TANIMURA, T. *tim^{rit}* Lengthens circadian period in a temperature-dependent manner through suppression of PERIOD protein cycling and nuclear localization. **Molecular and Cellular Biology**, 19(6): 4343-4354, 1999.
- MATSUMOTO, A.; OHTA, Y.; ITOH, T.Q., SANADA-MORIMURA, S.; MATSUYAMA, T.; FUCHIKAWA, T.; TANIMURA, T.; MIYATAKE, T. *Period* Gene of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) Among Strains with Different Mating Times and Sterile Insect Technique. **Annals of the Entomological Society of America**, 101(6): 1121-1130, 2008.
- MAZZONI, C.J.; GOMES, C.A.; SOUZA, N.A.; DE QUEIROZ, R.G.; JUSTINIANO, S.C.B.; WARD, R.D.; KYRIACOU, C.P.; PEIXOTO, A.A. Molecular Evolution of *period* Gene in Sandflies. **Journal of Molecular Evolution**, 55: 553-562, 2002.

- MAZZOTTA, G.M.; SANDRELLI, F.; ZORDAN, M.A.; MASON, M.; BENNA, C.; CISOTTO P.; ROSATO, E.; KYRIACOU, C.P.; COSTA, R. The clock gene *period* in the medfly *Ceratitis capitata*. **Genet Res Camb**, 86: 13–30, 2005.
- MCDONALD, M.J.; ROSBASH, M.; EMERY, P. Wild-type circadian rhythmicity is dependent on closely spaced E boxes in the *Drosophila* timeless promoter. **Molecular and Cellular Biology**, 21(4): 1207-1217, 2001.
- MESA, A. Acerca de la cariólogia de Ommexechidae (Orthoptera; Acridoidea). **Rev Soc Urug Ent**, (5): 37-43, 1963.
- MESA, A.; FERREIRA, A. Cytological studies in the family Ommexechidae (Orthoptera; Acridoidea). **Acrida**, (6): 261-271, 1977.
- MESA, A.; FERREIRA, A. Do the Australian Morabinae and the neotropical Proscopiidae evolve from a common ancestor? A cytogenetical point of view (Orthoptera: Caelifera, Eumastacoidea). **Acrida**, 10: 205–217, 1981.
- MESA, A.; FERREIRA, A.; CARBONELL, C.S. Cariólogia de los Acridoideos Neotropicales: Estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. **Annis Soc Ent Fr (N.S)**, 18(4): 507-526, 1982.
- MESA, A.; FONTANETTI, C.S.; COSTA H. The karyotype of the grasshopper *Spathalium helios* Rehn 1918. (Orthoptera; Acridoidea; Ommexechidae). **Rev Bras Genet**, 13(4): 705-710, 1990.
- MEYER-BERNSTEIN, E.L.; SEHGAL, A. Molecular regulation of circadian rhythms in *Drosophila* and mammals. **Neuroscientist**, 7(6): 496-505, 2001.
- MIYATAKE, T.; MATSUMOTO, A.; MATSUYAMA, T.; UEDA, H.R.; TOYOSATO, T.; TANIMURA, T. The *period* gene and allochronic reproductive isolation in *Bactrocera cucurbitae*. **Proc R Soc Lond**, 269: 2467-2472, 2002.
- MORIYAMA, Y.; SAKAMOTO, T.; KARPOVA, S.G.; MATSUMOTO, A.; NOJI, S.; TOMIOKA, K. RNA Interference of the Clock Gene *period* Disrupts Circadian Rhythms in the Cricket *Gryllus bimaculatus*. **Journal of Biological Rhythms**, (23)4: 308-318, 2008.
- MOURA, R.C.; SOUZA, M.J.; MELO, N.F.; LIRA-NETO, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). **Hereditas**, 138: 200–206, 2003.
- NIELSEN, J.; PEIXOTO, A.A.; PICCIN, A.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P.; CHALMER, D. Big Flies, Small Repeats: The “Thr-Gly” Region of the *Period* Gene in *Diptera*. **Molecular Biology and Evolution**, 11(6): 839-853, 1994.

- NUMANO, R.; YAMAZAKI, S.; UMEDA, N.; SAMURA, T.; SUJINO, M.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; MORI, A.; YAMADA, K.; SAKAKI, Y.; INOUE, S.T.; MENAKER, M.; TEI, H. Constitutive expression of the *Period1* gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103(10): 3716-3721, 2006.
- PAGE, T.L. Circadian Rhythms, **Circadian Rhythms**. Vanderbilt University, page 165, 2005.
- PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci USA** 64:600-604, 1969a.
- PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, 168: 1356-1358, 1969b.
- PEDERSEN, D.B.; CASSONE, V.M.; EARNEST, D.J.; GOLDEN, S.S.; HARDIN, P.E.; THOMAS, T.L.; ZORAN, M.J. Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms. **Nature Reviews Drug Discovery**, published online; doi:10.1038/nrd1633, 2005.
- PESCHEL, N.; HELFRICH-FÖRSTER, C. Setting the clock - by nature: Circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, 2011.
- PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **Inf J Insect Morphol Embryol**, 25(1/2): 115-133, 1996.
- PICCIN, A.; COUCHMAN, M.; CLAYTON, J.D.; CHALMERS, D.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P. The clock gene *period* of the housefly, *Musca domestica*, rescues behavioral rhythmicity in *Drosophila melanogaster*: Evidence for intermolecular coevolution? **Genetics**, 154(2): 747-758, 2000.
- PREUSS, F.; FAN, J.Y.; KALIVE, M.; BAO, S.; SCHUENEMANN, E.; BJES, E.S.; PRICE, J.L. *Drosophila* doubletime mutations which either shorten or lengthen the period of circadian rhythms decrease the protein kinase activity of casein kinase 1. **Molecular and Cellular Biology**, 24(2): 886-898, 2004.
- RANZ, J.M.; CASALS, F.C.; RUIZ, A. How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. **Genome Research**, 11: 230-239, 2001.
- REGIER, J.C.; FANG, Q.Q.; MITTER, C.; PEIGLER, R.S.; FRIEDLANDER, T.P.; SOLIS, M.A. Evolution and Phylogenetic Utility of the *period* Gene in Lepidoptera. **Molecular Biology and Evolution**. 15(9): 1172-1182, 1998.

- RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; SANTOS, J.F. A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade. **Floresta e Ambiente**, 13(2): 11-24, 2006.
- RIEGER, T.T.; OLIVEIRA E SILVA, S.V.; PACHECO, I.A.; CHAGAS, B.S.; SANTOS, J.F. Localization of *HSP* single-copy genes by inexpensive, permanent non-fluorescent *in situ* hybridization on meiotic chromosomes of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Acrididae). **Genet Mol Res**, 6(3): 643-649, 2007.
- ROCHA, M.F.; MELO, N.F.; SOUZA, M.J. Comparative cytogenetic analysis of two grasshopper species of the tribe Abracrini (Ommatolampinae, Acrididae). **Genetics and Molecular Biology**, 34(2): 214-219, 2011.
- ROCHA, M.F.; SOUZA, M.J.; MOURA, R.C. Karyotypic analysis, constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). **Caryologia**, 57(1): 107-116, 2004.
- RONDEROS, R.A. Notas para una revisión de la subfamillia Ommexechinae, VIII, El genero *Ommexecha* Serville (Orthoptera, Acridomorpha). **Rev Soc Ent Argentina**, 36 (1-4): 97-111, 1978.
- RONDEROS, R.A. La familia Ommexechidae (Orthoptera; Acridoidea). **Acrida**, 8(4): 241-273, 1979.
- ROSATO, E.; KYRIACOU, C.P. Flies, clocks and evolution. **Phil Trans R Soc Lond**, 365: 1769-1778, 2004.
- ROSATO, E.; PEIXOTO, A.A. GALLIPPI, A.; KYRIACOU, C.P.; COSTA, R. Mutational Mechanisms, Phylogeny, and Evolution of a Repetitive Region Within a Clock Gene of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Molecular Evolution**. 42: 392-408, 1996.
- ROWELL, C.H.F.; FLOOK, P.K. Phylogeny of the Caelifera and the Orthoptera as derived from ribosomal RNA gene sequences. **J Orthopt Res**, 7: 147-156, 1998.
- SAEZ, L.; YOUNG, M.W. In situ localization of the per clock protein during development of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biology** 8(12): 5378-5385, 1988.
- SAEZ, L.; YOUNG, M.W. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* 17(5): 911-920, 1996.
- SAHARA, K.; MAREC, F.; TRAUT, W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. **Chromosome Research**, 7: 449-460, 1999.

- SAKAI, T.; TAMURA, T.; KITAMOTO, T.; KIDOKORO, Y. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. **PNAS**, 101: 45-53, 2004.
- SANDRELLI, F.; TAUBER, E.; PEGORARO, M.; MAZZOTTA, G.; CISOTTO, P.; LANDSKRON, B.; STANEWSKY, J.R.; PICCIN, A.; ROSATO, E.; ZORDAN, M.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P. A Molecular Basis for Natural Selection at the timeless Locus in *Drosophila melanogaster*. **Science**, 316: 1898-1900, 2007.
- SAWYER, L.A.; SANDRELLI, F.; PASETTO, C.; PEIXOTO, A.A.; ROSATO, E.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P. The period Gene Thr-Gly Polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* Populations: Implications for Selection. **Genetics**, 174: 465–480, 2006.
- SCHAEFFER, S.W.; BHUTKAR, A.; MCALLISTER, B.F.; MATSUDA, M.; MATZKIN, L.M.; O'GRADY, P.M.; ROHDE, C.; VALENTE, V.L.S.; RIEGER, T.T.; et al. Polytene Chromosomal Maps of 11 *Drosophila* Species: The Order of Genomic Scaffolds Inferred From Genetic and Physical Maps. **Genetics**, 179: 1601-1655, 2008.
- SCHWARZACHER, T.; HARRISON-HESLOP, P. Practical *in situ* Hybridization. **Bios Scientific Publishers Limited**, 200p, 2000.
- SEHGAL, A. Genetic dissection of the circadian clock: A timeless story. **Seminars in Neuroscience**, 7(1): 27-35, 1995a.
- SEHGAL, A. Molecular genetic analysis of circadian rhythms in vertebrates and invertebrates. **Current Opinion in Neurobiology**, 5(6): 824-831, 1995b.
- SCHEPER, T.O.; KLINKENBERG, D.; VAN PELT, J.; PENNARTZ, C. A model of molecular circadian clocks: multiple mechanisms for phase shifting and a requirement for strong nonlinear interactions. **Journal of Biological Rhythms**, 14(3): 213-220, 1999.
- SHAFER, O.T.; ROSBASH, M.; TRUMAN, J.W.; Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Neuroscience**, 22(14): 5946-5954, 2002.
- SHAFER, O.T.; LEVINE, J.D.; TRUMAN, J.W.; HALL, J.C. Flies by night: Effects of changing day length on *Drosophila's* circadian clock. **Current Biology**, 14(5): 424-432, 2004.
- SIEPKA, S.M.; YOO, S.H.; PARK, J.; SONG, W.; KUMAR, V.; HU, Y.; LEE, C.; TAKAHASHI, J.S. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and *period* gene expression. **Cell**, 129(5):1011-1023, 2007.

- SO, W.V.; SAROV-BLAT, L.; KOTARSKI, C.K.; MCDONALD, M.J.; ALLADA, R.; ROSBASH, M. *Takeout*, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. **Molecular and Cellular Biology**, 20(18): 6935-6944, 2000.
- SONG, H.; BUHAY, J.E.; WHITING, M.F.; CRANDALL, K.A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 105: 13486–13491, 2008.
- SONG, H. Grasshopper systematics: past, present and future. **Journal of Orthoptera Research**, 19(1): 57-68, 2010.
- SOUZA, M.J.; HAVER P.R.; MELO, N.F. Karyotype, C and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae). **Caryologia**, 56(3): 261-267, 2003.
- SOUZA, M.J.; KIDO, L.M.H. Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of three family Romaleidae (Orthoptera). **Rev Bras Genet**, 18: 517-520, 1995.
- SOUZA, M.J.; MELO, N.F. Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera-Acridae- Cyrtacanthacridinae): Karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region (NORs). **Genetics and Molecular Biology**, 30(1): 54-59, 2007.
- SOUZA, M.J.; PEREIRA, L.G. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae; Orthoptera). **Cytobios**, 103: 111-119, 2000.
- SOUZA, M.J.; RUFAS, J.S.; ORELLANA, J. Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Orthoptera; Romaleidae). **Caryologia**, 51: 73-80, 1998.
- SOUZA, M.J.; SILVA FILHA, M.H.N.L. Effects of extra chromosome segments on chiasma distribution in *Xyleus angulatus* (Orthoptera; Romaleidae). **Rev Bras Genet**, 16: 23-33, 1993.
- STANEWSKY, R.; FRISCH, B.; BRANDES, C.; HAMBLIN-COYLE, M.J.; ROSBASH, M.; HALL, J.C. Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene period and a lacZ reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. **The Journal of Neuroscience**, 17(2): 676-696, 1997.
- STANEWSKY, R. Clock mechanisms in *Drosophila*. **Cell Tissue Research**, (309): 11-26, 2002
- SURI, V.; HALL, J.C.; ROSBASH, M. Two novel doubletime mutants alter circadian properties and eliminate the delay between RNA and protein in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, 20(20): 7547-7555, 2000.

- SWIGER, R.R.; TUCKER, J.D.; HEDDLE, J. A. A method for detecting transgenic animals without cell culture using fluorescence *in situ* hybridization. **Biotechniques**, 18: 952-958, 1995.
- SWORD, G.A.; SENIOR, L.B.; GASKIN, J.F.; JOERN, A. Double trouble for grasshopper molecular systematics: intra-individual heterogeneity of both mitochondrial 12S-valine-16S and nuclear internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences in *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae). **Systematic Entomology**, 32: 420–428, 2007.
- TAUBER, E.; LAST, K.S.; OLIVE, P.J.W.; KYRIACOU, C.P. Clock Gene Evolution and Functional Divergence. **Journal of Biological Rhythms**, 19: 445-458, 2004.
- TAUBER, E.; ZORDAN, M.; SANDRELLI, F.; PEGORARO, M.; OSTERWALDER, N.; BREDA, C.; DAGA, A.; SELMIN, A.; MONGER, K.; BENNA, C.; ROSATO, E.; KYRIACOU, C.P.; COSTA, R. Natural Selection Favors a Newly Derived timeless Allele in *Drosophila melanogaster*. **Science**, (316): 1895-1898, 2007.
- TAYLOR, P.; HARDIN, P.E.; Rhythmic E-box binding by CLK-CYC controls daily cycles in *per* and *tim* transcription and chromatin modifications. **Molecular and Cellular Biology**, 28(14): 4642-4652, 2008.
- THACKERAY, J.R.; KYRIACOU, C.P. Molecular Evolution in the *Drosophila yakuba period* Locus. **Journal of Molecular Evolution**, 31: 389-401, 1990.
- TYSON, J.J.; HONG, C.I.; THRON, C.D.; NOVAK, B. A simple model of circadian rhythms based on dimerization and proteolysis of PER and TIM. **Biophysical Journal**, 77: 2411–2417, 1999.
- VIEIRA, J.; VIEIRA, C.P.; HARTL, D.L.; LOZOVSKAYA, E.R. A framework physical map of *Drosophila virilis* based on P1 clones: applications in genome evolution. **Chromosoma**, 106: 99-107, 1997.
- VIELHABER, E.L.; DURICKA, D.; ULLMAN, K.S.; VIRSHUP, D.M. Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(49): 45921-45927, 2001.
- VILARDI, J.C. Parallel polymorphisms for interstitial C-bands and B-chromosomes in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). **Caryologia**, 39 (3-4): 365-380; 1986.
- WILSBACHER, L.D.; TAKAHASHI, J.S. Circadian rhythms: molecular basis of the clock. **Current Opinion in Genetics and Development**, 8(5): 595-602, 1998.

- WOLF, K.W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. **Inf J Insect Morphol Embryol**, 25(1/2): 37-62, 1996.
- WÜLBECK, C.; SZABO, G.; SHAFER, O.T.; HELFRICH-FÖRSTER, C.; STANEWSKY, R. (2005) The novel *Drosophila tim^{blind}* mutation affects behavioral rhythms but not periodic eclosion. **Genetics**, 169(2): 751-766, 2005.
- XIANG-ZHONG, Z.; YA-PING, Z.; DING-LIANG, Z.; ZHEN-CHENG, G. The *period* Gene: High Conservation of the Region Coding for Thr–Gly Dipeptides in the *Drosophila nasuta* Species Subgroup **Journal of Molecular Evolution**, 49: 406–410, 1999.
- XU, Y.; TOH, K.L.; JONES, C.R.; SHIN, J.Y.; FU, Y.H.; PTÁČEK, L.J. Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. **Cell**, 128(1): 59-70, 2007.
- YANG, Z.; SEHGAL, A. Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. **Neuron**, 29(2): 453-467, 2001.
- YOUNG, M.W. Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. **Trends in Biochemistry Science**, 25(12): 601-606, 2000.
- ZAHLER, P.M. Agricultura vs ecologia no combate ao gafanhoto *Rhammatocerus* sp. **Ciên Cult**, 39: 703-706, 1987.
- ZIMIN, P.I.; GORTCHAKOV, A.A.; DEMAPOV, S.A.; ZHIMULEV I.F. A New Construct for Cloning DNA and Modeling the Structure of *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes. **Molecular Biology**, 38(2): 205–209, 2004.