

Sandra Vasconcelos Oliveira e Silva

**Mapeamento por hibridização *in situ* dos genes *Lys*
Hsp70 e *Hsp83* nos cromossomos meióticos do gafanhoto
Schistocerca pallens (ACRIDIDAE)**

Recife

2004

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Genética
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Sandra Vasconcelos Oliveira e Silva

**Mapeamento por hibridização *in situ* dos genes *Lys*
Hsp70 e *Hsp83* nos cromossomos meióticos do gafanhoto
Schistocerca pallens (ACRIDIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Genética do Departamento
de Genética da Universidade
Federal de Pernambuco como
requisito para a obtenção do
grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Tassinari Rieger

Co-orientador: Prof. Dr. José Ferreira dos Santos

Recife

2004

Mapeamento por hibridização *in situ* dos genes *Lys Hsp70* e *Hsp83* nos cromossomos meióticos do gafanhoto *Schistocerca pallens* (ACRIDIDAE)

Sandra Vasconcelos Oliveira e Silva

Profa. Dra. Tania Tassinari Rieger
Departamento de Genética - UFPE (Orientadora)

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Profa. Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes
Departamento de Patologia - UPE

Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima
Departamento de Micologia - UFPE

Profa. Dra. Maria José de Souza
Departamento de Genética - UFPE

Membros Suplentes:

Profa. Dra. Rosilda dos Santos Silva
Departamento de Genética - UFPE

Profa. Dra. Rita de Cássia de Moura
Departamento de Biologia - UPE

Ao meu esposo e ao meu filho

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Tania Tassinari Rieger, que me aceitou no Laboratório de Genética Animal (UFPE) no primeiro momento em que aqui estive e deu-me a oportunidade de chegar onde estou.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Ferreira dos Santos, por sua dedicação, paciência e incentivo.

Ao meu marido Moisés, pelo incentivo e compreensão de infinitas horas de ausência do convívio familiar.

Ao meu filho Arthur, minha fonte de inspiração para trilhar os caminhos da vida.

Ao técnico Pedro (UFRPE), pelos inesquecíveis dias de coleta em Pombos (PE), onde obtive as maiores lições de prática que o convívio pode oferecer.

Ao Prof. Álvaro Teixeira (UFRPE), por quem tenho profunda admiração e respeito pelo incentivo em realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Maria José de Souza (UFPE), pela cessão de material, pelas sugestões e disponibilidade em me auxiliar.

Ao Prof. Dr. Marcos Morais, pela cessão de material e disponibilidade e competência com que me auxiliou na quantificação do DNA plasmidial.

Agradecimento especial à minha amiga do Laboratório de Genética Animal (UFPE), doutoranda Vilma Loreto, pela bondade e paciência com que tirou minhas dúvidas em citogenética de gafanhotos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Genética de Microrganismos (UFPE): Sérgio, Leonardo, Pierre, Hélio, Isis, Luis Rodrigo e outros.

Ao meu amigo João Batista, que me inspirou no apaixonante caminho da Genética.

Ao meu amigo Sérgio Campos, que foi meu professor na preparação de lâminas de *Drosophila*.

Ao meu amigo Léo, que estava sempre pronto a tirar minhas dúvidas.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Sr. Humberto, Sra. Wanda, Sta. Flávia e Sr. André, pelo bom atendimento na Secretaria.

À Dra. Rosilda S. Silva (UFPE), pelas muitas e valiosas sugestões de correção do texto.

À Dra. Neide Santos (UFPE), pelo incentivo em realizar este trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genética Animal (UFPE) Ebenézer Bernardes, Marcelle, Danielle, Marilane, Cirlene da Silva e Francisca Tavares por me auxiliarem no uso dos equipamentos do laboratório.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Agradecimentos | v |
| Lista de figuras | 8 |
| Lista de tabelas | 9 |
| RESUMO | 10 |
| I. INTRODUÇÃO | 11 |
| I.1. Objetivo geral | 14 |
| II. REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| II.1. Pragas de gafanhotos | 16 |
| II.2. Características gerais dos gafanhotos | 18 |
| II.3. O gafanhoto <i>Schistocerca pallens</i> (Thunberg) sec. Dirsh | 20 |
| II.4. Inimigos naturais e controle biológico dos gafanhotos | 23 |
| II.5. Resposta imunológica e mecanismo de resistência dos gafanhotos aos microrganismos | 24 |
| II.6. Genes de resposta aos estresses | 26 |
| II.7. Genética de gafanhotos | 28 |
| II.8. Localização de genes por hibridização <i>in situ</i> | 31 |
| III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |
| IV. ARTIGO | 43 |
| Localização dos genes de cópia única <i>Lys</i> , <i>Hsp70</i> e <i>Hsp83</i> por hibridização <i>in situ</i> em cromossomos do gafanhoto <i>Schistocerca pallens</i> (Acrididae, Orthoptera)..... | 44 |
| V. CONCLUSÕES | 63 |
| VI. ABSTRACT | 66 |
| VII. ANEXO | 67 |

Lista de figuras

- Figura II.1.** Fotografia de um exemplar macho do gafanhoto *Schistocerca pallens* (fotografia cedida pela Dra. Maria José de Souza UFPE).
..... 21
- Figura 1.** Marcações (setas) por hibridização *in situ* em cromossomos meióticos de *Schistocerca pallens*: localização do gene *Lys* no cromossomo **G**₁ em células na fase de diplóteno (**A**) e metáfase I (**B**), localização do gene *Hsp70* no cromossomo **G**₂ em células em paquíteno (**C**) e metáfase I (**D**), localização do gene *Hsp83* no cromossomo **M**₇ em células em paquíteno (**E**) e metáfase I (**F**). Barra = 1 µm. 52
- Figura 2.** Idiograma do complemento cromossômico meiótico de *Schistocerca pallens* mostrando a localização aproximada dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* mapeados..... 54
- Figura VII.1.** Metáfase mitótica (**A**) e cariótipo (**B**) de *Schistocerca pallens* (fotografia cedida pela Dra. Maria José de Souza UFPE).
..... 64
- Figura VII. 2.** Mapa do Estado de Pernambuco com a indicação dos locais de coleta (●) dos espécimes de *Schistocerca pallens*. 69

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela II.1. Posição taxonômica do gafanhoto <i>Schistocerca pallens</i> | 22 |
| Tabela II.2. Número cromossômico e mecanismo de determinação sexual de algumas espécies Neotropicais do gênero <i>Schistocerca</i> (Cyrtacanthacridinae Acrididae). | 29 |
| Tabela 1. Número (N) e porcentagem (%) de marcações em cromossomos meióticos do gafanhoto <i>Schistocerca pallens</i> pelas sondas dos genes <i>Lys Hsp70</i> e <i>Hsp83</i> através da técnica de PISH..... | 53 |
| Tabela VII.1. Número de espécimes do gafanhoto <i>Schistocerca pallens</i> coletados durante o período de 2001 até 2003 com as coordenadas geográficas dos locais de coleta..... | 70 |

RESUMO

Algumas espécies de gafanhotos são pragas milenares de áreas cultivadas em diversas regiões do mundo, provocando grandes prejuízos econômicos e ecológicos em períodos de explosão populacional. No Brasil, as espécies mais ameaçadoras, que causam danos significativos às lavouras e pastagens, são *Rhammatocerus schistocercoides*, *Stiphra robusta* e *Schistocerca pallens*, nenhuma das quais foi geneticamente bem caracterizada, apesar da grande importância prática. Neste trabalho foi iniciada a caracterização genética de *S. pallens*, através da localização por hibridização *in situ* dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* em cromossomos meióticos. Aproximadamente 700 núcleos foram analisados para os três genes e o percentual médio de marcação foi de 68,49%. Após análise de 108 núcleos marcados, com uma frequência de 94,44% o gene *Lys* foi mapeado no cromossomo **G**₁. O gene *Hsp70* foi mapeado no cromossomo **G**₂, onde foram observadas 89,94% das marcações do total de 199 núcleos marcados. Para o loco *Hsp83* foram contados 163 núcleos marcados, dos quais 97,54% das marcações foram localizadas em um cromossomo médio identificado como **M**₇. Para todos os genes hibridizados outras marcações foram observadas, mas todas em frequências inferiores a 30%. Estes são os primeiros genes mapeados em *S. pallens*, sendo também os primeiros genes de cópia única mapeados na família Acrididae. Além de servir como novos marcadores para individualização cromossômica, os dados da localização destes genes poderão ser úteis como marcas físicas para um eventual programa de seqüenciamento genômico da espécie.

I. INTRODUÇÃO

Os gafanhotos são insetos da ordem Orthoptera, que apresentam metamorfose incompleta e formato de corpo e tamanho variáveis e algumas espécie são citadas desde a antiguidade como pragas causadoras de sérios prejuízos à agricultura e às pastagens. Além de devastadoras, suas nuvens migratórias chamam a atenção pela agregação em massa e, em algumas espécies, pela grande capacidade de deslocamento. A coincidência entre condições ambientais ótimas e o ciclo biológico levaria ao desenvolvimento do processo de gregarização, dependente da densidade populacional e caracterizado pelo comportamento agressivo (Bouaïchi e Simpson, 2003; Rogers e cols., 2003; Matheson e cols., 2004). Modificações no ambiente, principalmente no agroecossistema, tais como desmatamento, super-pastagem, irrigação de grandes superfícies, mecanização das culturas e introdução de novas variedades de vegetais, poderiam levar à explosão populacional e à gregarização (Duranton e cols., 1987; Bouaïchi e Simpson, 2003).

Vinte e três espécies de gafanhotos causam danos economicamente expressivos à agricultura brasileira, além de problemas ambientais. Três dessas espécies são as mais prejudiciais: *Schistocerca pallens* (no Nordeste e Distrito Federal), *Stiphra robusta* (no Nordeste) e *Rhammatocerus schistocercoides* (em Mato Grosso, Rondônia e Goiás). Os Estados do Nordeste que têm apresentado as maiores infestações são Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Estas infestações podem estar relacionadas a períodos climáticos adversos, manejo de solo com a introdução de novas culturas e o abandono do cultivo de variedades tradicionalmente utilizadas pelos agricultores nestas regiões (Zahler, 1987; Barrientos, 1995; Avidos e Ferreira, 1997).

Apesar da grande importância prática, nenhuma das três espécies de gafanhotos praga na região Nordeste foi caracterizada geneticamente. A maioria dos estudos genéticos em gafanhotos da Região Neotropical é limitada aos trabalhos de citogenética convencional, identificando o número e a morfologia dos cromossomos em diversos representantes, incluindo a família Acrididae e algumas espécies de *Schistocerca* (subfamília Cyrtacanthacridinae). As espécies deste gênero, assim como *S. pallens*, possuem cariótipo com $2n=23, XO$ e $24, XX$, em machos e fêmeas, respectivamente (Mesa e cols., 1982). Mais recentemente, algumas espécies da subfamília Leptysminae foram estudadas

I. INTRODUÇÃO

citogeneticamente, tendo sido analisados, além do número e forma cromossômica, também a localização da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (Loreto e Souza, 2000; Rocha e cols., 2004).

Apesar de numerosos trabalhos visando o controle biológico dos gafanhotos por fungos entomopatogênicos (Blanford e Thomas, 2001; Seyoum e cols., 2002), inclusive de *S. pallens* (Xavier-Santos e cols., 1999a) e *R. schistocercoides* (Magalhães e cols., 1997), a genética do sistema imunológico destes organismos, fundamental para o conhecimento dos mecanismos de resistência aos fungos (Adamo, 2004), também tem sido pouco estudada. Considerando o grande impacto econômico do gênero *Schistocerca*, a escassez de uma melhor caracterização genética é surpreendente. A literatura pertinente está restrita à clonagem e caracterização de alguns genes em *S. gregaria* de maior importância na África e Velho Mundo (Janssen e cols., 2001; Picone e cols., 2001; Simonet e cols., 2002a). Esta espécie, ao lado do gafanhoto migratório *Locusta migratoria* (Simonet e cols. 2002b), são as mais estudadas dos pontos de vista genético e fisiológico.

Neste trabalho iniciamos a caracterização do genoma de *S. pallens*, através da localização cromossômica dos genes de cópia única da lisozima (*Lys*) e de resposta a estresse, *Hsp70* e *Hsp83*, pela técnica de hibridização *in situ* permanente (PISH, “Permanent *In Situ* Hybridization”). Estes três genes atuam nas respostas celulares de defesa e homeostase dos organismos. A lisozima atua diretamente no mecanismo de defesa, destruindo a parede celular de microrganismos, e na ativação do sistema enzimático da fenoloxidase, levando à efetivação da resposta imunológica através da melanização localizada (Gillespie e cols., 2000). As proteínas de choque térmico são importantes para permitir a resposta adequada aos diversos estresses celulares e ambientais, facilitando a remoção de proteínas anormais e protegendo as novas proteínas, desde sua síntese até a aquisição da forma tridimensional (Santoro, 2000). O mapeamento de genes é uma importante ferramenta para a identificação e individualização precisa de vários cromossomos da espécie nem sempre possibilitada pelas técnicas de citogenética convencional, devido ao tamanho e forma similares, como na maioria dos acridídeos (Mesa e cols. 1982). A localização de genes também é fundamental para futuros trabalhos de genômica da espécie pois as posições dos genes servem como marcas físicas para guiar um eventual programa de seqüenciamento.

I. 1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi iniciar a caracterização citogenética e molecular do gafanhoto praga *Schistocerca pallens*.

Objetivo Específico

Mapear genes de cópia única em cromossomos meióticos de *S. pallens*, através de localização por hibridização *in situ* permanente (PISH), usando sondas heterólogas:

1. o gene *Lys*, que codifica uma lisozima relacionada aos mecanismos de defesa contra microrganismos,
2. os genes *Hsp70* e *Hsp83*, que codificam proteínas de resposta aos estresses.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1. Pragas de gafanhotos

Os gafanhotos são citados desde a antiguidade como uma praga causadora de sérios prejuízos à agricultura, devastando plantações, pastagens e a vegetação de áreas próximas. Estima-se que enxames de *Schistocerca gregaria* na África podem variar de 10^5 a 10^{10} indivíduos, capazes de devorar de 14.000 a 20.000 toneladas métricas de vegetação verde por dia, causando completa destruição da safra de grãos, desfolhamento das árvores e destruição geral da vegetação (Dirsh, 1974; Steedman, 1990; Breuer e cols., 2003; Ferenz e Seidelmann, 2003). Além de devastadoras, as nuvens migratórias de gafanhotos chamam a atenção pela agregação massal, e em algumas espécies, pela grande capacidade de deslocamento. A multiplicação massal é atribuída a um complexo favorável de condições ecológicas que facilitam a sobrevivência da espécie em diferentes estágios do desenvolvimento. Por exemplo, chuvas que favoreçam o desenvolvimento de ovos em regiões de clima árido e levem ao aumento da produção de massa vegetal que alimentam os estágio ninfais, além da temperatura do ar e a existência de poucos predadores e parasitas naturais. O aumento populacional é um processo gradual, ao longo de 11 ou às vezes 22 anos, atingindo um pico e voltando ao nível inicial. A coincidência entre condições ambientais (bióticas ou abióticas) ótimas e o ciclo biológico, no tempo e no espaço, levaria à gregarização. Modificações no ambiente, principalmente no agroecossistema, tais como o desmatamento, a super-pastagem, a irrigação de grandes superfícies, a monocultura, a mecanização das culturas e a introdução de novas variedades de vegetais, poderiam levar à explosão populacional e à gregarização (Duranton e cols., 1987; Gallo e cols., 2002; Bouaïchi e Simpson, 2003; Ferenz e Seidelmann, 2003; Rogers e cols., 2003; Matheson e cols., 2004).

O aumento populacional leva a mudanças de comportamento e indivíduos gregários induzem à gregarização os indivíduos solitários, que passam da “fase solitária” para a “fase gregária”, devido a estímulos mecânicos, visuais e de contato químico (Breuer e cols., 2003; Ferenz e Seidelmann, 2003; Matheson e cols., 2004). Este polimorfismo de fases caracteriza estas espécies como polifênicas (Hägele e Simpson, 2000; Bouaïchi e Simpson,

2003). Em *Schistocerca gregaria*, espécie causadora de grandes destruições no Continente Africano, o processo de gregarização é acompanhado por alterações fisiológicas, comportamentais, morfológicas e de pigmentação, provavelmente disparadas por fatores endócrinos (Tawfik e Mohammed, 1997; Rogers e cols., 2003). Estes fatores são bem conhecidos, sendo caracterizados pela liberação de uma mistura de feromônios, principalmente fenilacetoneitrila, que modula o comportamento de agregação e induz as alterações que o acompanham, incluindo o aumento do número de mitocôndrias e de ribossomos de certos tecidos (Tawfik e cols., 2000; Tawfik e Sehnal, 2003).

No Brasil, cerca de 23 espécies de gafanhotos causam danos economicamente expressivos à agricultura, sendo as mais prejudiciais *S. pallens* (no Nordeste e Distrito Federal), *Stiphra robusta* (no Nordeste) e *Rhammatocerus schistocercoides* (em Mato Grosso, Rondônia e Goiás). Essas espécies podem causar grandes danos à vegetação nativa e às culturas agrícolas, sobretudo às plantações de arroz e cana-de-açúcar. A espécie *S. pallens*, em particular, representa um sério problema no Nordeste brasileiro. Os surtos desta espécie ocorrem alternadamente, entre anos de chuva e seca, trazendo prejuízos significativos às culturas, especialmente nos Estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco e Alagoas. No Sul do Brasil, nos anos de 1938, 1942 e 1946, infestações de *S. cancellata* causaram sérios prejuízos à produção agrícola, quando este gafanhoto, saindo da Argentina, migrou para o Sul e Centro-Sul do Brasil, do Rio Grande do Sul a Minas Gerais. Em 1969 registrou-se infestação de *R. pictus* na região sorocabana de São Paulo. De 1971 a 1974 *Dichropolus bergii* e *Staurorhectus longicornis* infestaram milharais e pastagens no Norte de Minas Gerais. Em 1984 ocorreu a explosão populacional de *R. schistocercoides*, que saindo da reserva indígena Parecis-Nhambiquara (MT) infestaram lavouras de cana-de-açúcar, arroz e pastagens na região Centro-Oeste. Na década de 90 ocorreram muitas infestações de gafanhotos em sete Estados: Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Rondônia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. Na Região Nordeste, *S. pallens* e *Stiphra robusta* ainda se encontram na fase solitária, mas já apresentando tendência à fase gregária, reunindo-se em bandos compactos, apresentando semelhança com nuvens. Os gafanhotos destas espécies alimentam-se de gramíneas nativas, como o timbete e o capim-milha, passando a danificar depois culturas de milho, cana-de-açúcar, feijão e algodão. Quando adultos, realizam vôos de dispersão e atacam as culturas e pastagens, causando grandes

prejuízos. Estas infestações podem estar relacionadas com fatores climáticos adversos, manejo de solo com a introdução de novas culturas e o abandono do cultivo de variedades tradicionalmente utilizadas pelos agricultores nestas regiões (Zahler, 1987; Barrientos, 1995; Avidos e Ferreira, 1997).

II.2. Características gerais dos gafanhotos

Os gafanhotos são insetos pertencentes à ordem Orthoptera, apresentando metamorfose incompleta, com fases de ovo ninfas e adulto. Os ovos são geralmente depositados dentro do solo, em caules de plantas ou sob folhas de plantas aquáticas. Condições climáticas adequadas, com chuvas e altas temperaturas, são fatores que propiciam o desenvolvimento do ovo e o nascimento das ninfas. As fases de ninfas são semelhantes à fase adulta, porém sem o desenvolvimento total das asas, no caso das espécies com asas. Várias espécies podem apresentar quiescência (parada eventual do desenvolvimento) em qualquer estágio, induzida por condições ambientais desfavoráveis e imediatamente ultrapassada quando reaparecem condições favoráveis, ou diapausa, parada obrigatória induzida por um fator com variações previsíveis (Duranton e cols., 1987; Gallo e cols., 2002).

Os gafanhotos possuem tamanhos médios de 6 mm a 12 cm de comprimento, com envergadura alar de até 23 cm. Seu corpo é revestido por um tegumento duro, composto de segmentos articulados por membranas flexíveis e coloração originária dos pigmentos das células epidérmicas ou consequência da difração da luz sobre a cutícula. Apresentam o corpo cilíndrico, grosso ou estreito nas extremidades, com variação de acordo com a espécie (Duranton e cols., 1987; Gallo e cols., 2002).

Os gafanhotos têm sexos separados e os ovos liberados pelas fêmeas desenvolvem-se apenas após a fusão com o espermatozóide. O sistema reprodutor consiste de glândulas sexuais pares, os ovários nas fêmeas e os testículos nos machos, com gonodutos pareados nos quais os produtos sexuais são descarregados, e um duto mediano coberto com cutícula de origem ectodérmica, formando a vagina, nas fêmeas, e o canal ejaculador, nos machos (Duranton e cols., 1987; Gallo e cols., 2002).

A classificação atual utilizada para os gafanhotos da superfamília Acridoidea da Região Neotropical é a proposta por Amedegnato (1974), que os reagrupou em seis famílias. Segundo Carbonell (1977), famílias como Proscopiidae, Tristiridae, Ommexechidae, Romaleidae e Pauliniidae são autóctonas desta região, com origem provável na América do Sul. Mesmo a família Acrididae, de distribuição mundial, tem dez subfamílias representadas na região Neotropical, cinco das quais são exclusivamente Neotropicais.

A fauna de gafanhotos do Nordeste brasileiro é bastante rica e diversificada, mas ainda é pouco conhecida dos pontos de vista de distribuição geográfica e de taxonomia. Dados sobre distribuição e diversidade de gafanhotos da região têm sido obtidos a partir da década de 1990 pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Citogenética Animal (Departamento de Genética) da UFPE, em coletas realizadas em áreas da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco e de outros Estados, como a Bahia. Uma lista preliminar indica que as famílias mais representativas da região são Acrididae, com 72 espécies, e Romaleidae, com 26 espécies (Souza, comunicação pessoal). Uma exploração mais cuidadosa desta região provavelmente proporcionará a descrição de espécies novas, como ocorreu com *Radacridium nordestinum* (Carbonell, 1984), *R. mariajoseae* e *R. adamantinum* (Carbonell, 1996a) e *Orthoscapheus noronhensis* (Carbonell 1996b), que são endêmicas da região.

Os estudos realizados com *R. schistocercoides* levaram à conclusão de que a maturação sexual das populações parece ser induzida independentemente das condições pluviométricas. Provavelmente existe uma diapausa imaginal que se finaliza em data fixa. A maturação sexual parece iniciar-se sistematicamente na segunda quinzena do mês de agosto, antes mesmo das primeiras chuvas. Como a maturação inicia-se em data fixa, as populações acridianas podem se encontrar em condições ecológicas radicalmente diferentes de um ano para outro, o que traz conseqüências importantes em relação à sobrevivência do inseto em estação seca, à fecundidade das fêmeas e ao desenvolvimento embrionário (Launois-Luong e Lecoq, 1996).

II.3. O gafanhoto *Schistocerca pallens* (Thunberg) sec. Dirsh

A família Acrididae ocorre em todos os Continentes e na maioria das regiões insulares, não tendo sido descrito apenas no Japão, região Indu-Malaya e ilhas Australasianas. Pelo menos 74 espécies ocorrem no continente Americano, sendo que algumas destas espécies possuem subespécies. Ainda existem dúvidas se este gênero seria originário do Velho Mundo e teria invadido as Américas, ocupando um nicho ecológico vazio e sofrendo rápida especiação ou, se originado nas Américas, teria migrado para o Velho Mundo, originando duas subespécies (Amedegnato, 1974; Dirsh, 1974; Carbonell, 1977; Duranton e cols., 1987; Gallo e cols., 2002).

O gafanhoto *S. pallens* (Fig. II.1), pertencente à superfamília Acridoidea, família Acrididae e subfamília Cyrtacanthacridinae (Tabela II.1), é encontrado com grande abundância no Estado de Pernambuco. É um inseto considerado de tamanho grande, medindo o macho de 4 a 5 cm e a fêmea de 5 a 6,5 cm. Os élitros são manchados de castanho e marcados por uma faixa longitudinal amarelo-creme na área costal. A coloração geral pode variar do marrom claro para o marrom escuro ou com estas duas cores juntas. A coloração dos adultos pode mudar de acordo com seu habitat e tal mudança pode estar relacionada ao tipo de alimentação. No Nordeste, onde apresenta duas gerações por ano, ocorre parada do desenvolvimento do ovo na estação seca. Mesmo que ocorram surtos densos, ainda não é gregário, mas ataca pastagens e lavouras de milho, trigo, cevada, amendoim, luzerna, sorgo, cana-de-açúcar, eucalipto, mimosa, álamo e ameixeira (Duranton e cols., 1987; Zahler, 1987; Barrientos, 1995; Avidos e Ferreira, 1997).

Coletas realizadas na região Nordeste do Brasil, a partir do início da década de 1990, mostraram a ocorrência de três espécies, *S. pallens*, *S. nitens* e *S. flavofasciata*, sendo *S. pallens* a mais abundante (Souza, comunicação pessoal). Dados das observações realizadas durante a manutenção dos animais em cativeiro revelaram que o tempo médio de vida de *S. pallens* ficou em torno de 30 dias. Além disso, o número médio de ovos por postura foi de 39,5 e a média de embriões por número de ovos obtidos foi de 16,5% (Calvacanti e Lopes, 2000).



Figura II.1. Fotografia de um exemplar macho do gafanhoto *S. pallens* (fotografia cedida pela Dra. Maria José de Souza, UFPE).

Tabela II. 1. Posição taxonômica do gafanhoto *S. pallens*.

| Filo | Classe | Ordem | Superfamília | Família | Subfamília | Gênero | espécie |
|------------|---------|------------|--------------|-----------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Arthropoda | Insecta | Orthoptera | Acridoidea | Acrididae | Cyrtacanthacridinae | <i>Schistocerca</i> | <i>S. pallens</i> |

Fontes: Duranton e cols. (1987); Gallo e cols. (2002).

II. 4. Inimigos naturais e controle biológico dos gafanhotos

A influência dos fatores bióticos de regulação da dinâmica das populações acridianas geralmente é secundária, quando comparada aos fatores abióticos (meteorológicos, em particular). No entanto, a lista de inimigos naturais dos gafanhotos é extensa: pássaros são os mais freqüentemente citados, mas o seu impacto sobre as populações do gafanhoto é pontual (Fornari 1986), formigas apresentam atividade predadora muito intensa sobre bandos de ninfas durante toda a estação das chuvas e ataques de vespas parasitas foram observados. O comportamento de ataque e de nidificação da vespa *Prionyx thomae* contra *R. schistocercoides*, assim como as reações de defesa do gafanhoto, foram descritos por Lecoq e Pierozzi Jr (1995), que discutem o papel deste himenóptero como eventual agente de controle das populações acridianas.

A única perspectiva realista de utilização de inimigos naturais para controle biológico reside atualmente no emprego de micoinseticidas à base de esporos de fungos deuteromicetos entomopatogênicos, os quais têm sido estudados já há alguns anos, em particular na África (Prior e Greathead, 1989; Blanford e Thomas, 2001). No Brasil, as linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. flavoviride* var. *flavoviride* e de *Beauveria bassiana* estão sendo estudadas na Embrapa (CENARGEN) e no Laboratório de Controle Biológico (Departamento de Micologia) da UFPE (Faria e Magalhães, 1993; Magalhães e cols. 1997; Xavier-Santos e cols., 1999a, b). As pesquisas realizadas já confirmaram o grande potencial destes fungos para o controle das populações acridianas, inclusive com a seleção de linhagem adaptada ao *R. schistocercoides* (Faria e Magalhães, 1993; Magalhães e cols., 1997) e às condições ecológicas nas quais ele vive. Formulações comerciais dos fungos entomopatogênicos já estão disponíveis comercialmente, mas ainda são utilizadas em pequena escala.

II.5. Resposta imunológica e mecanismo de resistência dos gafanhotos aos microrganismos

A característica fundamental de todo sistema imunológico é a capacidade de distinguir e eliminar partes de um corpo estranho, como bactérias e vírus. A habilidade de reconhecer a presença de um organismo ou de uma substância estranha é fundamental para o sistema imunológico. Os insetos não possuem o sistema imunológico sofisticado dos vertebrados, mas são particularmente resistentes aos seus inimigos naturais. Para se defender, eles desenvolveram uma série de mecanismos, tais como reações de reconhecimento, aglutinação e ativação de enzimas proteolíticas, que levam à coagulação da hemolinfa e à produção de melanina, reações celulares e síntese de peptídios antimicrobianos e inibidores de proteases. Essas reações de defesa fazem parte da imunidade natural dos insetos, chamada sistema profenoloxidase (proPO). Como o sistema complemento dos vertebrados, o proPO é ativado por uma série de enzimas em uma cascata de reações que termina com conversão da profenoloxidase na enzima fenoloxidase ativa, que tem um papel importante na captura e eliminação de formas estranhas. Entre as enzimas da cascata estão a lisozima e a laminarina, cujas atividades proteolíticas estão, portanto, relacionadas à resposta imunológica dos insetos (Wheeler e cols., 1993; Söderhäll e Cerenius, 1998; Wilson e cols., 1999).

Nos insetos, embora a natureza das moléculas de reconhecimento não esteja bem definida, alguns receptores associados à membrana dos hemócitos e outros solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas. A interação lectina-carboidrato e a ativação da cascata proPO podem ser considerados como mecanismos mediadores no processo de reconhecimento de patógenos e parasitóides. As lectinas têm sido detectadas na hemolinfa, agindo como opsoninas (proteínas que se fixam e transformam as propriedades da superfície dos patógenos), aglutinando os microorganismos, deste modo otimizando a sua fagocitose (Boucias e Pendland, 1993; Drif e Brehélin, 1994; Kawasaki e cols., 1996; Wilson e cols., 1999).

As espécies de gafanhotos pragas apresentam mecanismo de resistência aos fungos utilizados no controle biológico (Bateman e cols. 1993, Gillespie e cols. 1998). No gafanhoto *S. gregaria* a infecção pelo fungo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* leva à

significativa redução no consumo de alimento (Seyoum e cols., 1994) e a sua resistência ao fungo está relacionada com a resposta imunológica que leva à melanização local pela atividade da enzima fenoloxidase (Gillespie e cols., 1998; Gillespie e cols., 2000).

A fenoloxidase catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos. O produto final dessa oxidação é a melanina, que participa de três importantes processos fisiológicos: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas (Ashida e cols., 1983; Brookman e cols., 1989; Rowley e cols., 1990; Marmaras e cols., 1993; Lee e cols., 1999; Silva e cols., 2000). A fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microorganismos invasores como para o próprio inseto, por isso sua ativação é limitada ao local de infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada, letal para o inseto (Kanost, 1999; Ma e Kanost, 2000).

As lisozimas de insetos têm a dupla função de ajudar na digestão e na defesa contra bactérias (Jelles e Jolles, 1984), sendo sua produção induzida quando ocorre infecção (Dunn e cols., 1994; Hultmark, 1996). Foi demonstrado que a lisozima é expressa em tecidos de cutícula da epiderme, sendo a primeira linha de defesa em insetos como *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster*, que se alimentam de microorganismos decompositores (Lemos e Terra, 1991; Lemos e cols., 1993; Dafre e cols., 1994; Ito e cols., 1995; Fujita e cols., 2002). As lisozimas são enzimas relativamente pequenas, com cerca de 14,6 kDa, de estrutura tridimensional compacta, que estão presentes na hemolinfa dos insetos. Elas lisam as bactérias, hidrolisando as cadeias glicídicas da camada de peptidoglicanas da parede celular. A lisozima, que é uma glicosidase, catalisa a hidrólise da ligação glicosídica entre o C-1 do ácido N-acetilmurâmico ou N-acetilmureína (NAM) e o C-4 da N-acetilglucosamina (NAG). A remoção dessa cadeia, mesmo em pequena escala, provoca a ruptura da parede celular e, devido à alta pressão osmótica interna, causa a morte das bactérias (Mushegian e cols., 1996).

Dada a importância das lisozimas na resposta imunológica dos insetos aos microorganismos invasores, genes que codificam estas enzimas já foram clonados de diversos insetos, como *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Bombyx mori* e *Hyalophora cecropia*, entre outros (Hultmark, 1993; 1996; Dafre e cols., 1994; Kang e cols., 1996; Gao e Fallon, 2000). Em *D. melanogaster* ocorre

um agrupamento de oito genes de lisozima na região 61F do braço cromossômico **III**L, além de outros cinco genes dispersos no genoma (Dafre e cols., 1994; Adams e cols., 2000).

II.6. Genes de resposta aos estresses

Em estudo de tecido da glândula salivar de *Drosophila* foi descoberto que a exposição dessas células ao calor produzia o surgimento de um novo padrão transcricional nos pufes dos cromossomos politênicos. Foi verificado que os estresses térmico ou químico induziam a expressão de genes até então inativos, fazendo com que as células estressadas fabricassem grande quantidade de uma determinada classe de proteínas, que foram chamadas de proteínas do choque térmico (“Heat shock proteins”, Hsp). O processo pelo qual as células respondiam ao estresse ficou conhecido como resposta ao choque térmico (Ashburner e Bonner, 1979; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000).

A resposta aos estresses é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão das proteínas Hsp, o que não ocorre apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros estímulos, incluindo análogos de aminoácidos, hormônios, diversos metais pesados, infecção microbiana, antibióticos e outros venenos metabólicos (Santos e cols., 1993; Jindal, 1996; Kiang e Tsokos, 1998; Goto e Kimura, 1998; Santoro, 2000).

As Hsp são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde procariotas até o homem, o que é sugestivo de grande importância evolutiva. Os genes das Hsp podem ser agrupados em famílias, de acordo com as seqüências de aminoácidos e os pesos moleculares das proteínas: *HSP27*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* e *HSP100*. Em cada família há diferentes proteínas, como por exemplo Hsp72 e Hsp73 na família Hsp70, cujos pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão dos respectivos genes são distintos (Vazquez e cols., 1993; Trent, 1996; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro 2000).

As proteínas Hsp não são induzidas apenas em condições de estresse. Há componentes desta classe protéica, conhecidas como cognatas ou Hsc (“Heat shock

cognates”), que são expressos constitutivamente, isto é, em organismos não submetidos a condições de estresse. As formas cognatas não são idênticas às formas indutíveis, sendo expressas em quantidades muito menores. O principal mecanismo de ação das Hsp seria como chaperonas moleculares (Hartl e cols., 1994; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000). As chaperonas, embora não façam parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliando na síntese e na montagem final do dobramento conformacional, evitando a degradação durante a tradução e até a aquisição da conformação final. O dobramento de proteínas é um processo muito importante em biologia, pois converte cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, as quais possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades. As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes em suas formas nativas completamente dobradas. Na medida em que o choque térmico e outras condições estressantes causam um efeito de desnaturação ou desdobramento parcial das proteínas celulares, a capacidade das hsp de proteger as células contra os efeitos adversos do estresse torna-se fundamental. Ademais, as Hsp aumentam a rapidez de remoção de proteínas desnaturadas (Craig e cols., 1994; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000).

Os níveis aumentados de proteínas de estresse dão às células meios para: a) identificar e facilitar o redobramento de proteínas afetadas de modo adverso pelo estresse metabólico; b) identificar e fazer ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, facilitando assim a eliminação das proteínas danificadas; c) facilitar a síntese e a maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico (Welch, 1993; Trent, 1996; Santoro, 2000).

A família *HSP27*, que produz as proteínas também conhecidas como sHsp (Hsp de baixo peso molecular), são transcritas durante o ciclo celular e no desenvolvimento e diferenciação em *Drosophila* e outros organismos (Marin e Tanguay, 1996; Santoro, 2000). As famílias *HSP60* e *HSP70* são as mais relacionadas ao processo geral de dobramento conformacional de proteínas nas células. Entre as famílias, a *HSP70* é a mais conservada filogeneticamente, havendo 72% de homologia entre as Hsp70 do homem e de *Drosophila* (Pardue e cols., 1992; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000). A família *HSP90*, também filogeneticamente conservada, apresenta função regulatória, ligando-se aos hormônios

esteróides, como a ecdisona, e então aos sítios promotores de genes que respondem a eles. Além disso, aproximam moléculas facilitando a sua junção e dissociando-se posteriormente dos complexos resultantes (Mutsuddi e Lakhotia, 1995; Nathan e cols., 1997). Os genes da família *HSP100* são importantes para o desenvolvimento de tolerância a estresses, evitando os possíveis danos causados pelo aumento de temperatura e permitindo a adaptação às novas condições, como por exemplo em linhagens de *Sacharomyces cerevisiae*, onde a Hsp104 leva à termotolerância, principalmente na ausência de locos funcionais de Hsp70 (Parsell e cols., 1994; Sanchez e cols., 1993; Santoro, 2000).

II. 7. Genética de gafanhotos

Existem numerosos trabalhos visando o controle biológico dos gafanhotos por fungos entomopatogênicos (Blanford e Thomas, 2001; Seyoum e cols., 2002), inclusive de espécies prejudiciais à agricultura brasileira, como *S. pallens* (Xavier-Santos e cols., 1999a, b) e *R. schistocercoides* (Faria e Magalhães, 1993; Magalhães e cols., 1997). Entretanto, a genética destes organismos tem sido pouco estudada, embora seja fundamental para o conhecimento dos mecanismos de defesa contra os fungos (Adamo, 2004).

A maioria dos estudos genéticos em gafanhotos da Região Neotropical é limitada aos trabalhos de cariologia convencional, identificando o número e a morfologia dos cromossomos em diversos representantes, incluindo a família Acrididae e algumas espécies de *Schistocerca* (subfamília Cyrtacanthacridinae). Na análise de 284 espécies de acridídeos desta região, Mesa e cols. (1982) observaram que os cariótipos são tipicamente compostos por cromossomos de difícil individualização, devido à semelhança de tamanho e forma, e concluíram que o cariótipo básico é $2n=23$ (XO), nos machos e $2n=24$ (XX), nas fêmeas. Derivações deste cariótipo básico são encontradas principalmente em alguns gêneros da subfamília Melanoplinae (Mesa e cols., 1982). Posteriormente, estudos citogenéticos realizados em sete espécies da família Romaleidae (Souza e Silva Filha, 1993; Souza e Kido, 1995; Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1998; Pereira e Souza, 2000), cinco da família Proscopiidae (Moura e cols., 1996; Souza e Moura, 2000) e seis da família Acrididae (Loreto e Souza, 2000; Rocha e cols., 2004), que ocorrem na região Nordeste do

Brasil, forneceram os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva, da localização das regiões organizadoras de nucléolos e da ocorrência de cromossomos B, além de confirmar o número e forma cromossômicas e o mecanismo de determinação sexual descrito anteriormente por Mesa e cols. (1982). As espécies da família Acrididae citogeneticamente caracterizadas foram *Belosacris coccineipes* (Loreto e Souza, 2000) e *Cornops aquaticum*, *C. frenatum frenatum*, *Stenopola dorsalis*, *Stenacris xanthochlora* e *Tucayaca parvula* (Rocha e cols., 2004), todos possuindo cariótipos similares, mas apresentando diferenças na localização de blocos distais de heterocromatina constitutiva, no padrão de distribuição de blocos CMA₃ e na localização das regiões organizadoras de nucleólos.

Da mesma maneira que os outros gafanhotos investigados na região Nordeste, os representantes da subfamília Cyrtacanthacridinae (gênero *Schistocerca*), apresentam cromossomos acro-telocêntricos, 2n=23 nos machos e 2n=24 nas fêmeas (Tabela II. 2), reunidos conforme o tamanho em três grupos: grandes (**G₁** **G₂** e **G₃**), médios (**M₄** **M₅** **M₆** **M₇** **M₈** e **X**) e pequenos (**P₉** **P₁₀** e **P₁₁**), com sistema de determinação sexual XX, XO (MESA e cols., 1982; Cavalcanti e Lopes, 2000).

Tabela II. 2. Número cromossômico e mecanismo de determinação sexual de algumas espécies Neotropicais do gênero *Schistocerca*.

| Espécie | Nº diplóide | Mec. Sexual |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Schistocerca cancellata</i> | 23 24 | XO: XX |
| <i>S. cancellata paranensis</i> | 23 24 | XO: XX |
| <i>S. flavofasciata</i> | 23 24 | XO: XX |
| <i>S. pallens</i> | 23 24 | XO: XX |
| <i>Schistocerca</i> sp. | 23 24 | XO: XX |

Fonte: Mesa e cols. (1982).

A grande maioria dos trabalhos de descrição de variabilidade genética em populações de gafanhotos foi realizada em espécies Neárticas. Algumas populações continentais e insulares de duas espécies de Gomphocerinae do Estado de Pernambuco foram geneticamente caracterizadas por estudos de isozimas. Ayres (1997) demonstrou que

R. brasiliensis possui baixa diferenciação genética entre populações, possivelmente devido ao endocruzamento ou ao pouco tempo de divergência populacional. Para *Orphulella punctata*, exclusivamente Neotropical, Balbino (1997) demonstrou a existência de moderada diferenciação genética entre as populações, atribuída à deriva genética.

Para a espécie *S. pallens*, além da descrição cariotípica pela análise convencional (Mesa e cols., 1982; Cavalcanti e Lopes, 2000) e da descrição preliminar da localização das regiões organizadoras de nucléolos e da distribuição de blocos de heterocromatina marcados por fluorocromos (Teixeira e cols., 1997), foi localizado na literatura somente o trabalho de Silveira e cols. (1998), que demonstraram por amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) que a espécie tem alta variabilidade genética intrapopulacional. Considerando o grande impacto econômico da espécie na América do Sul (Duraton e cols., 1987; Zahler, 1987; Barrientos, 1995; Avidos e Ferreira, 1997), a ausência de uma melhor caracterização genética é surpreendente.

Mesmo para outras espécies do gênero *Schistocerca*, a literatura pertinente está restrita à clonagem e caracterização de alguns genes em *S. gregaria*, de maior importância na África e Europa (Simonet e cols. 2002a). Esta espécie, ao lado do gafanhoto migratório *Locusta migratoria* (Simonet e cols. 2002b), são as mais estudadas dos pontos de vista genético e fisiológico. Em *S. gregaria* foram clonados e caracterizados os genes *abd-A* (Tear e cols., 1990), *abd-B* (Kelsh e cols., 1993) e o agrupamento dos genes homeóticos *Hox* (Ferrier e Akam, 1996), todos relacionados ao desenvolvimento, o gene para a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) (Wu e cols., 2001), dois genes de precursores de peptídeos neurotransmissores, chamados neuroparsinas (Janssen e cols., 2001), cinco genes de proteínas quimiorreceptoras de diferentes órgãos sensoriais (Angeli e cols., 1999; Picone e cols., 2001) e genes de duas isoformas de precursores de peptídeos inibidores de serino-proteases, chamados de pacifastinas (Vanden Broeck e cols., 1998; Simonet e cols., 2002a). No entanto, com exceção do complexo *Hox* (Ferrier e Akam, 1996), nenhum destes genes foi cromossomicamente localizado. Na verdade, entre os insetos, somente aqueles que possuem cromossomos politênicos, principalmente os dípteros dos gêneros *Drosophila* (Adams e cols., 2000), *Aedes* (Brown e Knudson, 1997), *Anopheles* (Kumar e Collins 1994), têm mapas gênicos prontos ou em construção, devido à facilidade de mapeamento nos cromossomos gigantes.

Um dos motivos para a escassez de estudos moleculares em ortópteros pode ser o tamanho do genoma dos gafanhotos. Por exemplo, o tamanho de 9,3 gigabases em *S. gregaria* (cerca de 52 vezes maior que o de *D. melanogaster*) impõe dificuldades para a clonagem e principalmente para um projeto de seqüenciamento genômico das espécies. Desta forma, os trabalhos sobre a clonagem de genes de ortópteros ainda são exemplos isolados (Hoy 1994). Apesar da importância prática evidente, nenhum dos genes relacionados à gregarização ou à susceptibilidade aos fungos utilizados em controle biológico foi clonado e caracterizado em relação à sua seqüência de nucleotídeos e regulação da expressão.

II.8. Localização de genes por hibridização *in situ*

As técnicas de biologia molecular revolucionaram a compreensão sobre a estrutura e função do DNA, tornando-se essenciais em experimentos biológicos, possibilitando a localização de genes ou seqüências de DNA e a comparação entre cariótipos de espécies próximas em estudos de evolução cromossômica. A técnica de hibridização permite verificar se uma determinada amostra de DNA apresenta homologia com uma sonda, que pode ser um RNA ou outro DNA (Lara, 1995), sendo um dos métodos mais precisos de identificar a localização genômica e assim mapear genes. Na técnica de hibridização *in situ* há a desnaturação simultânea da sonda de interesse e do material cromossômico depositado sobre uma lâmina, que posteriormente hibridizam.

A revelação da marcação por método fluorescente (FISH “**F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization”) tem sido mais difundida, mas a revelação não-fluorescente tem duas vantagens principais: a) econômica, por não exigir investimento em microscópio com filtros especiais; b) ser permanente, não exigindo análise imediata e permitindo reanálises posteriores. Embora na literatura não haja um nome específico para a hibridização *in situ* permanente, neste trabalho chamamos de PISH (“**P**ermanent **I**n **S**itu **H**ybridization”).

Devido ao interesse médico ou econômico, algumas espécies de mamíferos também são exemplos de espécies que têm mapas gênicos em construção, como é o caso do homem (Schuler e cols., 1996) e alguns primatas (De Pontbriand e cols., 2002), de bovinos (El

Nahas e cols., 2001; Antoniou e cols., 2002), do cavalo (Caetano e cols., 1999), do cão (Dutra e cols., 1996), do porco (Cirera e cols., 2003) e do gato (O'Brien e cols., 1997), além de outros. Entre as plantas, algumas espécies também têm mapas genéticos prontos ou em andamento, como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, além do milho e outros cereais (Fourmann e cols. 2002). A construção destes mapas utilizou diferentes técnicas, incluindo mapeamento paquitênico, hibridização *in situ* e análise de reassociação de DNA.

Em insetos, a técnica de hibridização *in situ* tem sido aplicada especialmente em cromossomos politênicos, como nos gêneros *Drosophila* (Bonorino e cols., 1993; Ruiz e cols., 1997; Rieger, 1999), *Rhagoletis* (Procurier e Smith, 1993), *Aedes* (Brown e Knudson, 1997) e *Anopheles* (Benedict e cols., 1993; Kumar e Collins, 1994), para localização de genes da família *Hsp27*, *Hsp70*, *Hsp90*, genes ribossômicos 18S e 5S e genes de amilase e esterase. Esta metodologia tem se mostrado útil também em estudos evolutivos, que comparam cromossomos politênicos entre *D. melanogaster* e outras espécies (Segarra e cols., 1995; Ranz e cols., 1997). Com exceção do trabalho de Brown e Knudson (1997), todos os demais citados neste parágrafo utilizaram a técnica de PISH.

Em gafanhotos, nas poucas publicações utilizando a técnica de hibridização *in situ*, foram utilizadas sondas específicas para caracterização de cromossomos através da identificação de regiões altamente repetitivas do DNA, como as regiões organizadoras de nucléolos (sítios de genes de rRNA), regiões teloméricas (sítios de replicação e estabilidade cromossômica) e diferentes classes de DNA satélite (famílias de DNA repetitivo), em *Eyprepocnemis plorans* (López-Leon e cols., 1994; López-Leon e cols., 1995), *Dociostauros genei* (Iñigo e cols., 1996) e *Xyleus angulatus* (Romaleidae, Souza e cols., 1998). Como exemplo de mapeamento gênico, foi encontrada apenas uma citação para o gênero *Schistocerca*, utilizando sondas para a região *Hox*, oriundas de *Drosophila*, para localizar este complexo gênico em *S. gregaria* (Ferrier e Akam 1996). Todos os trabalhos citados neste parágrafo utilizaram a técnica de FISH.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo SA (2004) Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *J Insect Physiol* 50:209-216.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers Y-HC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Miklos GLG, Abril JF, Agbayani A, Na H-J, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei M-H, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshre A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, n-Kiamos IS, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang Z-Y, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh R-F, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Amedegnato C (1974) Les genres d'acridiens Neotropicaux leur classification par familles sous-familles et tribus. *Acrida* 3:93-203.
- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P (1999) Purification structural characterization cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 262:745-754.
- Antoniou E, Gallagher D, Taylor J, Davis S, Womack J, Grosz M (2002) A comparative map of bovine chromosome 25 with human chromosomes 7 and 16. *Cytogenet Genome Res* 97:128-132.
- Ashburner M, Bonner JJ (1979) The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17: 241-257.

- Ashida M, Ishizaki Y, Iwahana H (1983) Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Comm* 113:562-564.
- Avidos MFD, Ferreira LT (1997) Gafanhotos a maldição milenar. *Biotec Ciênc Desenv* 2: 8-11.
- Ayres CFJ (1997) Estrutura genética de populações naturais de *Rhammatocerus brasiliensis* (Bruner 1904) (Acrididae: Gomphocerinae) do Estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Genética), UFPE, Recife, 65 p.
- Balbino VQ (1997) Estrutura genética de populações naturais de *Orphulella punctata* (Acrididae, Gomphocerinae) do Estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Genética), UFPE, Recife, 52 p.
- Barrientos LL (1995) The present state of the locust and grasshopper problem in Brazil. *J Orth Res* 4:61-64.
- Bateman R, Carey M, Moore D, Prior C (1993) The enhanced infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals Appl Biol* 122:145-152.
- Benedict MQ, Cockburn AF, Seawright JA (1993) The *Hsp70* heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Insect Mol Biol* 2:93-102.
- Blanford S, Thomas MB (2001) Adult survival maturation and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J Invert Pathol* 78:1-8.
- Bonorino CBC, Pereira M, Alonso CEV, Valente VLS, Abdelhay E (1993) *In situ* mapping of the *Hsp70* locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Braz J Genet* 16:561-571.
- Bouaïchi A, Simpson J (2003) Density-dependent accumulation of phase characteristics in a natural population of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Physiol Entomol* 28: 25-31.
- Boucias DG, Pendland JC (1993) The galactose binding lectin from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. *Insect Biochem Mol Biol* 23:233-242.
- Breuer M, Hoste B, De Loof A (2003) The endocrine control of phase transition: some new aspects. *Physiol Entomol* 28:3-10.
- Brookman JL, Rowley AF, Ratcliffe NA (1989) Studies on nodule formation in locust following injection of microbial products. *J Invert Pathol* 53:315-323.
- Brown SE, Knudson DL (1997) FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insect Mol Biol* 6:197-202.
- Caetano AR, Shiue YL, Lyons LA, O'Brien SJ, Laughlin TF, Bowling AT, Murray JD (1999) A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). *Genome Res* 9:1239-1249.
- Carbonell CS (1977) Origin evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): a preliminary hypothesis. *Rev Soc Ent Argentina* 36:153-175.
- Carbonell CS (1984) *Radacridium nordestinum* - a new genus and species of romaleid grasshoppers from the Brazilian caatinga (Orthoptera Acridoidea). *Proc Acad Nat Sci Philad* 136:123-129.
- Carbonell CS (1996a) New species of the genus *Radacridium* Carbonell 1984 (Acridoidea: Romaleidae: Romaleinae) from the Brazilian Northeast. *J Orth Res* 5: 37-41.

- Carbonell CS (1996b) Revision of the genus *Orthoscapheus* Bruner 1906 with description of a new species (Acrididae Ommatolampinae Abracrini). *J Orth Res* 5: 1-8.
- Cavalcanti LS, Lopes MJS (2000) Estudo sobre a biologia de gafanhoto (Orthoptera) em cativeiro e análise citogenética. www.propesq.ufpe.br/conic2000/pibic/ciencias. Acesso em 10/07/2002.
- Cirera S, Jorgensen CB, Sawera M, Raudsepp T, Chowdhary BP, Fredholm M (2003) Comparative mapping in the pig: localization of 214 expressed sequence tags. *Mammalian Genome* 14:405-426.
- Craig EA, Weissman JS, Horwich AL (1994) Heat shock protein and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78: 365-372.
- Dafre S, Kylten P, Samakovlis C, Hultmark D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet* 242:152-162.
- De Pontbriand A, Wang XP, Cavaloc Y, Mattei MG, Galibert F (2002) Synteny comparison between apes and human using fine-mapping of the genome. *Genomics*. 80:395-401.
- Dirsh VM (1974) Genus *Schistocerca* (Acridomorpha Insecta). Schmitschek E. (Ed.) Dr. W.Junk B. V. Publishers v. 10 238 p.
- Drif L, Brehelin M (1994) Purification and characterization of an agglutinin from hemolymph of *Locusta migratoria* (Orthoptera). *Insect Biochem Mol Biol* 24:283-289.
- Dunn PE, Bohnert TJ, Russel V (1994) Regulation of antibacterial protein synthesis following infection and during metamorphosis of *Manduca sexta*. In: Beck G. Cooper E.L. Habicht G.S. Marchalonis J.J. (Eds.) Primordial Immunity: foundations for the vertebrate immune system. New York Academy of Sciences New York pp. 117–130.
- Duranton JF, Launois M, Launois-Luong MH, Lecoq M (1987) Guia prático de luta contra os gafanhotos devastadores no Brasil. FAO Roma-CIRAD/PRIFAS Montpellier. 161p.
- Dutra AS, Mignot E, Puck JM (1996) Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. *Cytogenet Cell Genet* 74:113-117.
- El Nahas SM, de Hondt HA, Womack JE (2001) Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. *J Hered* 92:221-225.
- Faria MR, Magalhães BP (1993) Bioassay of *Metarhizium flavoviride* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides*. XXVIth Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology Asheville NC.
- Ferez H-J, Seidelmann K (2003) Pheromones in relation to aggregation and reproduction in desert locusts. *Physiol Entomol* 28:11-18.
- Ferrier DE, Akam M (1996) Organization of the *Hox* gene cluster in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13024-13029.
- Fornari C (1986) Gafanhoto: a praga bíblica no Brasil. *Rev Bras Ext Rural* 7:17-18.
- Fourmann M, Barret P, Froger N, Baron C, Charlot F, Delourme R, Brunel D (2002) From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor Appl Genet* 105:1196-1206.
- Fujita A, Minamoto T, Shimizu I, Abe T (2002) Molecular cloning of lysozyme encoding cDNAs expressed in the salivary gland of a wood-feeding termite *Reticulitermes speratus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1615–1624.

- Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002) Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba. 920p.
- Gao Y, Fallon AM (2000) Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. *Insect Mol Biol* 9:553-558.
- Gillespie JP, Bateman R, Charnley A K (1998) Role of cuticle-degrading protease in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Invert Pathol* 71:128-137.
- Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK (2000) The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J Insect Physiol* 46:429-437.
- Goto SG, Kimura MT (1998) Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J Insect Physiol* 44: 1233-1239.
- Hägele BF, Simpson SJ (2000) The influence of mechanical visual and contact chemical stimulation on the behavioural phase state of solitary desert locust (*Schistocerca gregaria*). *J Insect Physiol* 46:1295-1301.
- Hartl F-U, Hlodan R, Langer T (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci* 19:20-25.
- Hoy MA (1994) Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. Academic Press Inc. 546 p.
- Hultmark D (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet* 9:178-183.
- Hultmark D (1996) Insect lysozyme. In: Jolles P. (Ed.) Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology. Birkhauser Verlag Basel pp. 87–102.
- Iñigo ER, Fernández-Calvin B, Capel J, De La Veja GC (1996) Equilocality and heterogeneity of constitutive heterochromatin: *in situ* localization of two families of highly repetitive DNA in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). *Heredity* 76: 70-76.
- Ito Y, Nakamura M, Hotani T, Imoto T (1995) Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J Biochem* 118:546–551.
- Janssen T, Claeys I, Simonet G, De Loof A, Girardie J, Vanden Broeck J (2001) cDNA cloning and transcript distribution of two different neuroparsin precursors in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol Biol* 10:183-189.
- Jelles P, Jolles J (1984) What's new in lysozyme research? Always a model system today as yesterday. *Mol Cell Biochem* 63:165–189.
- Jindal S (1996) Heat shock proteins: applications in health and disease. *Trends Biotech* 14: 17-20.
- Kang D, Romans P, Lee J-Y (1996) Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene* 174:239-244.
- Kanost MR (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Develop Comp Immun* 23:291-301.
- Kawasaki K, Kubo T, Natori S (1996) Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the american cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Mol Biol* 26:355-364.
- Kelsh R, Dawson I, Akam M (1993) An analysis of abdominal-B expression in the locust *Schistocerca gregaria*. *Development* 117: 293-305.

- Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183-201.
- Kumar V, Collins FH (1994) A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosomes of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol Biol* 3:41-47.
- Launois-Luong MH, Lecoq M (1996) Sexual maturation and ovarian activity in *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) [Orthoptera, Acrididae, Gomphocerinae] a pest grasshopper of Mato Grosso State (Brazil). *Environ Entomol* 3:352-358.
- Lara FJS (1995) Hibridação de ácidos nucléicos. Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto 128 p.
- Lecoq M, Pierozzi Jr I (1995) Attaques de *Prionyx thomae* (Fabricius 1775) (Hymenoptera Sphecidae) sur un criquet ravageur *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn 1906) au Brésil (Orthoptera Acrididae). *Bull Soc Entomol Fr* 100:515-520.
- Lee HS, Cho MY, Lee KM, Kwon TH, Lee BL (1999) The prophenoloxidase of coleopteran insect *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Lett* 444:255-259.
- Lemos FJA, Ribeiro AF, Terra WR (1993) A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification properties and secretory mechanism. *Insect Biochem Mol Biol* 23:533-541.
- Lemos FJA, Terra WR (1991) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp Biochem Physiol* 100B:265-268.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87-92.
- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM, Camacho JPM (1995) Cloning and sequence analysis of extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75:370-375.
- Loreto V, Souza MJ (2000) Karyotype constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) in *Belosacris coccineipes* (Acrididae Leptysminae). *Genet Mol Biol* 23:575-579.
- Ma CC, Kanost MR (2000) A beta 1 3-glucan recognition protein from an insect *Manduca sexta* agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 275:7505-7514.
- Magalhães BP, Faria MR, Tigano MS, Sobral BWS (1997) Characterization and virulence of a Brazilian isolate of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes). *Mem Entomol Soc Canada* 171:313-321.
- Marin R, Tanguay RM (1996) Stage-specific localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 105: 142-149.
- Marmaras VJ, Bournazos SN, Katsoris PG, Lambropoulou M (1993) Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. *Arch Insect Biochem Physiol* 23:169-180.
- Matheson T, Rogers SM, Krapp HG (2004) Plasticity in the visual system is correlated with a change in lifestyle of solitary and gregarious locusts. *J Neurophysiol* 91:1-12.

- Mesa A, Ferreira A, Carbonell CS (1982) Cariologia de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. *Annls Soc Entomol Fr* 18:507-526.
- Moura RC, Souza MJ, Tashiro T (1996) Cytotaxonomic characterization of the genus *Scleratoscopia* and *Tetanorhynchus* (Orthoptera Proscopiidae). *Cytologia* 61:169-178.
- Mushegian A, Fullner KJ, Koonin EV, Nester EW (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7321-7326.
- Mutsuddi M, Lakhota SC (1995) Spatial expression of the *hsr-omega* (93D) gene in different tissues of *Drosophila melanogaster* and identification of promotor elements controlling its developmental expression. *Dev Genet* 17:303-311.
- Nathan DF, Vos MH, Lindquist S (1997) *In vivo* functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12949-12956.
- O'Brien SJ, Cevario SJ, Martenson JS, Thompson MA, Nash WG, Chang E, Graves JAM, Spencer JA, Cho KW, Tsujimoto H, Lyons LA (1997) Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered* 88:408-414.
- Pardue ML, Ballinger DG, Hogan NC (1992) The heat shock response. Cells coping with transient stress. *Annals New York Acad Sci* 663:125-138.
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein hsp104. *Nature* 372:475-478.
- Pereira LG, Souza MJ (2000) Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae Orthoptera). *Cytobios* 103:111-119.
- Picone D, Crescenzi O, Angeli S, Marchese S, Brandazza A, Ferrara L, Pelosi P, Scaloni A (2001) Bacterial expression and conformational analysis of a chemosensory protein from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 268:4794-4801.
- Prior C, Greathead DJ (1989) Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Protec Bull* 37:37-48.
- Procnunier WS, Smith JJ (1993) Localization of ribosomal DNA in *Rhagoletis pomonella* (Diptera:Tephritidae) by *in situ* hybridization. *Insect Mol Biol* 2:163-174.
- Ranz JM, Segarra C, Ruiz A (1997) Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. *Genetics* 145:281-295.
- Rieger TT (1999) Mapeamento por hibridação *in situ* e expressão no desenvolvimento de genes de resposta a estresses e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular UFRGS Porto Alegre 138 p.
- Rocha MF, Souza MJ, Moura RC (2004) Karyotypic analysis constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). *Caryologia* 57:107-116.
- Rocha MF, Souza MJ, Tashiro T (1997) Karyotypic variability in the genus *Radacridium* (Orthoptera Romaleidae Romaleinae). *Cytologia* 62:53-60.
- Rogers SM, Matheson T, Despland E, Dodgson T, Burrows M, Simpson SJ (2003) Mechanosensory-induced behavioural gregarization in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Exp Biol* 206:3991-4002.

- Rowley AF, Brookman JL, Ratcliffe NA (1990) Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust *Locusta migratoria* in antimicrobial activity. *J Invert Pathol* 56:31-38.
- Ruiz A, Ranz JM, Cáceres M, Segarra C, Navarro A, Barbadilla A (1997) Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. *Braz J Genet* 20: 553-565.
- Sanchez Y, Parsell DA, Taulien J, Vogel JL, Craig EA, Lindquist S (1993) Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol* 175:6484-6491.
- Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59:55-63.
- Santos JF, Lewgoy F, Valente VLS (1993) Heat shock puffs are induced by selenium in *Drosophila melanogaster*. *Dros Inf Sci* 72:145-146.
- Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, RodriguezTome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJR, Dibling T, Drouot N, Dunham I, Duprat S, East C, Edwards C, Fan JB, Fang N, Fizames C, Garrett C, Green L, Hadley D, Harris M, Harrison P, Brady S, Hicks A, Holloway E, Hui L, Hussain S, LouisDitSully C, Ma J, MacGilvery A, Mader C, Maratukulam A, Matisse TC, McKusick KB, Morissette J, Mungall A, Muselet D, Nusbaum HC, Page DC, Peck A, Perkins S, Piercy M, Qin F, Quackenbush J, Ranby S, Reif T, Rozen S, Sanders C, She X, Silva J, Slonim DK, Soderlund C, Sun WL, Tabar P, Thangarajah T, VegaCzamy N, Vollrath D, Voyticky S, Wilmer T, Wu X, Adams MD, Auffray C, Walter NAR, Brandon R, Dehejia A, Goodfellow PN, Houlgatte R, Hudson JR, Ide SE, Iorio KR, Lee WY, Seki N, Nagase T, Ishikawa K, Nomura N, Phillips C, Polymeropoulos MH, Sandusky M, Schmitt K, Berry R, Swanson K, Torres R, Venter JC, Sikela JM, Beckmann JS, Weissenbach J, Myers RM, Cox DR, James MR, Bentley D, Deloukas P, Lander ES, Hudson TJ (1996) A gene map of the human genome. *Science* 274:540-546.
- Segarra C, Lozovskaya ER, Ribó G, Aguadé M, Hartl DL (1995). P₁ clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Chromosoma* 104:129-136.
- Seyoum E, Bateman RP, Charnley AK (2002) The effect of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Annals Appl Biol* 126:119-124.
- Seyoum E, Moore D, Charnley AK (1994) Reduction in flight activity and food consumption by the desert locust *Schistocerca gregaria* after infection with *Metarhizium flavoviride*. *Z Angew Entomol* 118:310-315.
- Silva C, Gary BD, Rau ME (2000) Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Develop Comp Immun* 24:367-379.
- Silveira EB, Al-Janabi SM, Magalhães BP, Carvalho LJCB, Tigano MS (1998) Polymorphism of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) and its natural pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes) revealed by RAPD analysis. *Ann Soc Entomol Brasil* 27:91-99.
- Simonet G, Claeys I, November T, Wataleb S, Janssen T, Maes R, De Loof A, Vanden Broeck J (2002a) Cloning of two cDNAs encoding isoforms of a pacifastin-related

- precursor polypeptide in the desert locust *Schistocerca gregaria*: analysis of stage- and tissue-dependent expression. *Insect Mol Biol* 11:353-360.
- Simonet G, Claeys I, Vanderperren H, November T, De Loof A, Vanden Broeck J (2002b) cDNA cloning of two different serine protease inhibitor precursors in the migratory locust *Locusta migratoria*. *Insect Mol Biol* 11:249-256
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10:23-28.
- Souza MJ, Kido LMH (1995) Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). *Braz J Genet* 18:517-520.
- Souza MJ, Moura RC (2000) Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera Proscopiidae). *Cytobios* 101:137-144.
- Souza MJ, Rufas JS, Orellana J (1998) Constitutive heterochromatin NOR location in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Romaleidae). *Caryologia* 51:73-80.
- Souza MJ, Silva Filha MHNL (1993) Effects of extra chromosome segments on chiasma distribution in *Xyleus angulatus* (Orthoptera Romaleidae). *Braz J Genet* 16:23-33.
- Steedman A (1990) *Locust Handbook* 3rd ed. Natural Resources Institute Chatham.
- Tawfik AI, Sehna F (2003) A role for ecdysteroids in the phase polymorphism of the desert locust. *Physiol Entomol* 28:19-24.
- Tawfik AI, Treiblmayr K, Hassanali A, Osir EO (2000) Time-course haemolymph juvenile hormone titres in solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria* and their relation to pheromone emission CA volumetric changes and oocyte growth. *J Insect Physiol* 46:1143-1150.
- Tawfik AL, Mohammed MM (1997) Ultrastructure of the corpus allatum in the solitary and gregarious adult male *Schistocerca gregaria* in relation to pheromone production. *Bull Fac Sci Assiut University* 26:1-18.
- Tear G, Akan M, Martinez-Arias A (1990) Isolation of an *abdominal-A* gene from the locust *Schistocerca gregaria* and its expression during early embryogenesis. *Development* 110:915-926.
- Texeira LV, Oliveira PR, Souza MJ (1997) Coloração sequencial CMA³ / DA/DAPI e nitrato de prata em *Schistocerca pallens* (Acrididae-Cyrtacanthacridinae). XII ENGENE Maceió p 103.
- Trent JD (1996) A review of acquired thermotolerance heat-shock proteins and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiol Rev* 18:249-258.
- Vanden Broeck J, Chiou S-J, Schoofs L, Hamdaoui A, Vandenbussche F, Simonet G, Wataleb S, De Loof A (1998) Cloning of two cDNAs encoding three small serine protease inhibiting peptides from the desert locust *Schistocerca gregaria* and analysis of tissue-dependent and stage-dependent expression. *Eur J Biochem* 254:90-95.
- Vazquez J, Pauli D, Tissières A (1993) Transcriptional regulation in *Drosophila melanogaster* during heat shock: a nuclear run-on analysis. *Chromosoma* 102:233-248.
- Welch WJ (1993) How cells respond to stress. *Sci Am* 268:34-41.
- Wheeler MB, Stuart G, Hapner KD (1993) Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). *J Insect Physiol* 39:477-483.
- Wilson R, Chen C, Ratcliffe NA (1999) Innate immunity in insects – the role of multiple endogenous serum lectin in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis*. *J Immunol* 162:1590-1596.

- Wu Q, Andolfato P, Haunerland NH (2001) Cloning and sequencing of the gene encoding the muscle fatty acid binding protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol* 31:553-562.
- Xavier-Santos S, Magalhães BP, Luna Alves-Lima EA (1999a) Infectivity of *Metarhizium anisopliae* Gams e Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in the laboratory. *Annais Soc Entomol Brasil* 28:359-363.
- Xavier-Santos S, Magalhães BP, Luna Alves-Lima E A (1999b) Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes). *Rev Microbiol Entomol Brasil* 30:47-51.
- Zahler PM (1987) Agricultura vs ecologia no combate ao gafanhoto *Rhammatocerus* sp. *Ciênc Cult* 39:703-706.

IV. ARTIGO

Manuscrito a ser submetido à revista

Genetics and Molecular Biology

(ISSN 1415-4757, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP)

Localização dos genes de cópia única *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* por
hibridização *in situ* em cromossomos do gafanhoto *Schistocerca*
pallens (Acrididae, Orthoptera)

Sandra Vasconcelos Oliveira-Silva, Ísis Amorim Pachêco,
José Ferreira dos Santos e Tania Tassinari Rieger.

Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE),
Brasil.

TÍTULO CURTO

Localização dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* em *Schistocerca pallens*.

PALAVRAS-CHAVE

Schistocerca pallens, hibridização *in situ*, genes cópia única, mapeamento gênico, Acrididae.

Correspondência para Tania T. Rieger
Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Genética,
Av. Moraes Rêgo, s/n. Cidade Universitária,
CEP 50732-970, Recife (PE), Brasil.
Fone: (81) 2126 8520, Fax: (81) 2126 8569.
e-mail: rieger@ufpe.br

RESUMO

Algumas espécies de gafanhotos são pragas milenares de áreas cultivadas em diversas regiões do mundo, provocando grandes prejuízos econômicos e ecológicos em períodos de explosão populacional. No Brasil, as espécies mais ameaçadoras são *Rhammatocerus schistocercoides*, *Stiphra robusta* e *Schistocerca pallens*. Ao contrário das espécies pragas de outras regiões do mundo, nenhuma das espécies que causam danos às lavouras no Brasil foi geneticamente bem caracterizada, apesar da importância prática evidente. Neste trabalho, iniciamos a caracterização genética de *S. pallens*, através da localização dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* em cromossomos meióticos. O gene *Lys* foi mapeado no maior autossomo da espécie (**G₁**). O gene *Hsp70* foi mapeado no cromossomo **G₂**, enquanto *Hsp83* foi localizado em um cromossomo médio, identificado como **M₇**. Estes são os primeiros genes mapeados em *S. pallens*, sendo também os primeiros genes de cópia única mapeados na família Acrididae. Além de servir como novos marcadores para individualização cromossômica, os dados da localização destes genes poderão ser úteis como marcas físicas para um futuro programa de seqüenciamento genômico da espécie.

INTRODUÇÃO

As principais espécies de gafanhotos envolvidos nos grandes enxames que devoram plantações de diversas culturas, vegetação nativa ou pastagens pertencem ao gênero *Locusta* ou *Schistocerca* (Steedman, 1990). A formação dos enxames é um processo gradual, que ocorre ao longo de uma ou duas décadas, quando as condições ambientais favorecem o aumento populacional (Penner e Yerushalmi, 1998). Nestas espécies, chamadas polifênicas, devido ao polimorfismo de fases (Hägele e Simpson, 2000; Bouaïchi e Simpson, 2003), o aumento populacional leva a mudanças de comportamento, quando indivíduos gregários induzem à gregarização os indivíduos solitários, que passam da “fase solitária” para a “fase gregária”, devido a estímulos mecânicos, visuais e de contato químico (Breuer e cols., 2003; Ferenz e Seidelmann, 2003; Matheson e cols., 2004). Em *Schistocerca gregaria*, espécie causadora de grandes destruições no Continente Africano, o processo de gregarização é acompanhado por alterações fisiológicas, comportamentais, morfológicas e de pigmentação, provavelmente disparados por fatores endócrinos (Tawfik e Mohammed, 1997; Rogers e cols., 2003). Estes fatores são bem conhecidos, sendo induzidos pela liberação de uma mistura de feromônios, principalmente fenilacetoneitrila, que modula o comportamento de agregação e induz as alterações que o acompanham, incluindo o aumento do número de mitocôndrias e ribossomos de certos tecidos (Tawfik e cols., 2000; Tawfik e Sehnal, 2003).

A família Acrididae é amplamente distribuída no mundo, com numerosos gêneros de importância econômica ocorrendo na região Neotropical (Amedegnato, 1974; Carbonell, 1977; Mesa e cols., 1982; Gallo e cols., 2002). Pertencem a esta família duas das principais espécies de gafanhotos com potencial ou comportamento ocasional de praga no Brasil, *Rhammatocerus schistocercoides* e *S. pallens*, que causaram sérios problemas em zonas cultivadas e economicamente importantes do País. Uma terceira espécie, *Stiphra robusta*, da família Proscopiidae, também causa problemas similares (Duranton e cols., 1987; Zahler, 1987; Barrientos, 1995; Avidos e Ferreira, 1997). Nenhuma destas espécies foi genomicamente explorada, embora seja uma abordagem extremamente importante para compreensão da fisiologia, etologia e para controle biológico eficiente, como amplamente

demonstrado para os gafanhotos *S. gregaria* (Simonet e cols., 2002a) e *Locusta migratoria* (Simonet e cols., 2002b).

O cariótipo dos acridídeos é tipicamente composto por cromossomos de difícil individualização, devido à semelhança de tamanho e forma. O cariótipo básico é $2n=23$ (XO) nos machos e $2n=24$ (XX) nas fêmeas (Mesa e cols., 1982; Loreto e Souza, 2000; Rocha e cols., 2004). Derivações deste cariótipo básico são encontradas principalmente em alguns gêneros da subfamília Melanoplinae (Mesa e cols., 1982). Os representantes da subfamília Cyrtacanthacridinae apresentam cromossomos acro-telocêntricos, reunidos, conforme o tamanho, em três grupos: grandes (**G₁**, **G₂** e **G₃**), médios (**M₄**, **M₅**, **M₆**, **M₇**, **M₈** e **X**) e pequenos (**P₉**, **P₁₀** e **P₁₁**), com sistema de determinação sexual XX, XO. Estudos genéticos do gênero *Schistocerca* são restritos à descrição cariotípica pela análise convencional (Mesa e cols., 1982). A única exceção é *S. gregaria*, do qual foram clonados e caracterizados os genes *abd-A* (Tear e cols., 1990), *abd-B* (Kelsh e cols., 1993), o agrupamento dos genes homeóticos *Hox* (Ferrier e Akam, 1996), todos relacionados ao desenvolvimento, o gene para a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) (WU e cols., 2001), dois genes de precursores de peptídeos neurotransmissores neuroparsinas (Janssen e cols., 2001), cinco genes de proteínas quimiorreceptoras de diferentes órgãos sensoriais (Angeli e cols., 1999; Picone e cols., 2001) e genes de duas isoformas de precursores de peptídeos inibidores de serino-proteases, chamados de pacifastinas (Vanden Broeck e cols., 1998; Simonet e cols., 2002a). O tamanho do genoma dos gafanhotos, por exemplo em *S. gregaria*, de 9,3 gigabases (cerca de 52 vezes maior que o de *Drosophila melanogaster*), impõe dificuldades para a clonagem e, principalmente, para um projeto de seqüenciamento genômico das espécies. Por este motivo, a clonagem de genes de outras espécies de gafanhotos são exemplos isolados (Hoy, 1994). Apesar da importância prática evidente, nenhum dos genes relacionados à gregarização, ou à susceptibilidade aos fungos utilizados em controle biológico, foi clonado e caracterizado em relação à sua seqüência de nucleotídeos e regulação da expressão.

Uma abordagem inicial de exploração genômica mais simples que o seqüenciamento é a localização de genes de cópia única por hibridização *in situ*, que gera marcas físicas que poderão guiar futuros programas de seqüenciamento genômico. O mapeamento por hibridização *in situ* de genes também permitirá a detecção de processos

evolutivos envolvendo os cromossomos do grupo, quando comparado com as demais espécies da família. Neste trabalho é descrita pela primeira vez a localização cromossômica de genes de cópia única de *S. pallens*, os primeiros para a família Acrididae. Esta abordagem gerou marcas físicas que permitiram a individualização de três pares cromossômicos da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de espécimes

Foram utilizados neste trabalho 03 indivíduos adultos machos de *S. pallens*, coletados com rede entomológica no município de Pesqueira (8° 18' 45'' S, 36° 41' 15'' W), no Estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil. Os testículos foram dissecados e fixados em etanol e ácido acético (3:1) e armazenados em freezer para preparações citológicas, conforme Souza (1991).

Preparação de lâminas

Para a preparação de cada lâmina foi utilizado um único folículo testicular, colocado sobre a lâmina numa gota de ácido acético a 45%, coberto com lamínula e feito o esmagamento por pressão. As lâminas foram armazenadas a 4°C por 24 horas e as lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram submetidas a lavagens consecutivas de 2X SSC a 65°C por 30 minutos, etanol a 70% e 95%, ambos a 65°C por 10 minutos, e etanol a 70% e 95% à temperatura ambiente, ambos por 10 minutos (Engels e cols., 1986). Após secagem as lâminas foram armazenadas a 4°C e, posteriormente, selecionadas em microscópio para hibridização *in situ*.

Amplificação dos plasmídios

O plasmídio YIprd2-Lys contendo o gene completo da lisozima (*Lys*) humana e marca de resistência à ampicilina, foi cedido pelo Dr. Marcos Antônio de Morais Jr. (Departamento de Genética, UFPE). Fragmentos dos genes *Hsp70* e *Hsp83*, clonados do genoma de *D. melanogaster* (Livak e cols., 1978; Holmgren e cols., 1981), foram cedidos pela Dra. Eliana Abdelhay (Departamento de Biofísica, UFRJ), inseridos nos plasmídios pW229 e $\lambda 6$, ambos derivados do pBR322, com marca de resistência à ampicilina. Os plasmídios foram amplificados através de transformação por choque térmico na linhagem DH5 α da bactéria *Escherichia coli*, cultivada em meio LB com ampicilina e extraídos pela técnica de lise alcalina (Sambrook e cols., 1989). Para a utilização como sonda, o DNA plasmidial foi marcado com biotina utilizando o sistema BioNick DNA (GIBCO/BRL, Paisley, Escócia).

Hibridização *in situ*

O material cromossômico das lâminas foi pré-digerido com RNase para melhorar as marcações (López-León e cols., 1995), e lavagens estringentes foram realizadas à temperatura ambiente com 2X SSC (Engels e cols., 1986). A hibridização *in situ* foi realizada em tampão contendo formamida a 30% a 37°C por 40 horas, usando 100 ng de sonda marcada para cada lâmina. A revelação utilizou estreptoavidina/fosfatase alcalina (SAP), azul de nitro tetrazólio (NBT) e BCIP (fosfatase intestinal fetal bovina), todos da GIBCO/BRL (Paisley, Escócia). As lâminas foram contra-coradas com orceína-lactoacética (orceína 1% em ácido láctico 20% e ácido acético 45%, diluída 1:10 em ácido acético 45%), e posteriormente montadas com Entellan (Merck). As preparações obtidas têm marcação permanente, de maneira que a técnica pode ser chamada de hibridização *in situ* permanente (PISH).

Análise microscópica

Para cada lâmina hibridizada foram examinados em microscópio sob contraste de fase os núcleos nas diversas fases da meiose com cromossomos individualizados. Os sinais de marcação identificados foram contados e os melhores núcleos fotografados com filme Kodak Gold 100 em Fotomicroscópio Leica com objetiva de aumento de 100X. Uma vez que a técnica de PISH exige quantificação das marcas, foi considerado como critério de marcação consistente aquela com frequência superior a 30% do total de núcleos marcados.

RESULTADOS

Utilizando a técnica de PISH foram localizados os genes de cópia única *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* em cromossomos meióticos do gafanhoto *S. pallens*. A análise foi realizada em um total de 691 núcleos, com percentual médio de marcação de 68,49% para os três genes, tendo sido obtidas marcações consistentes, muito acima do mínimo de 30%, em três diferentes pares autossômicos.

Foram analisados 167 núcleos após hibridização com a sonda *Lys*, tendo sido obtidas marcações em 108 (64,67%). Dentre os núcleos marcados, 94,44% apresentaram marcações no maior autossomo da espécie (**G₁**), conforme pode ser observado na **Fig. 1 A e B**. Também foram observados 9 núcleos marcados em um cromossomo médio, com frequência de 8,33% do total (Tabela 1).

Para o gene *Hsp70* foram analisados 313 núcleos, dos quais 199 (63,57%) apresentaram marcas de hibridização. Em 89,94% dos núcleos marcados pela sonda *Hsp70* as marcas foram observadas no cromossomo **G₂** (**Fig. 1 C e D**). Também foram observadas marcações por esta sonda em um dos cromossomos médios, em 38 núcleos (frequência de 19,09%) e um único sinal de hibridização no cromossomo X (0,50%) (Tabela 1).

Na análise de hibridização do gene *Hsp83* foram observados 211 núcleos, tendo sido detectadas marcações em 163 (77,25%). Entre os núcleos marcados, 97,54% possuíam hibridização consistente em um par de cromossomos de tamanho médio, identificado como

M₇ (Fig. 1 E e F). Também foram encontrados 35 núcleos (21,47%) com hibridização da sonda *Hsp83* no cromossomo **G₂** e dois (1,22%) com marca em um dos cromossomos **P**.

No idiograma apresentado na Figura 2 são apontadas as localizações consideradas consistentes dos genes mapeados *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83*.

DISCUSSÃO

A metodologia de hibridização *in situ* foi proposta por Engels e cols. (1986) para cromossomos politênicos de *Drosophila*, e tem sido extensivamente utilizada em politênicos de dípteros (Benedict e cols., 1993; Procunier e Smith, 1993; Kumar e Collins, 1994; Segarra e cols., 1995; Ruiz e cols., 1997; Brown e Knudson, 1997; Rieger, 1999). Rieger (1999) salienta a necessidade de quantificação das marcações, de maneira que neste trabalho foi adotado como critério de marcação consistente aquela observada com frequência superior a 30% do total de núcleos marcados. Aproximadamente 700 núcleos foram analisados e o percentual médio de marcação para os três genes foi de 68,49%, demonstrando a eficácia da metodologia empregada.

Utilizando a técnica de PISH em cromossomos meióticos, neste estudo foram identificadas as primeiras localizações cromossômicas de genes de cópia única do gafanhoto *S. pallens*, que também são os primeiros para a família Acrididae. O gene *Lys*, mapeado no cromossomo **G₁** com frequência de 94,44% de marcação, também apresentou sinais menos frequentes (8,30%) de marcação em um cromossomo **M**, que pode representar um loco adicional de lisozima, uma vez que em outros insetos, como *D. melanogaster*, são encontrados 13 locos, oito agrupados na seção 61F do braço cromossômico **3L** e mais cinco dispersos pelo genoma (Dafre e cols., 1994; Adams e cols., 2000). Em *Anopheles gambiae*, utilizando hibridização em *dot blot* foi mapeado um loco de lisozima na divisão 27 do braço cromossômico **2L** (Kang e cols., 1996).

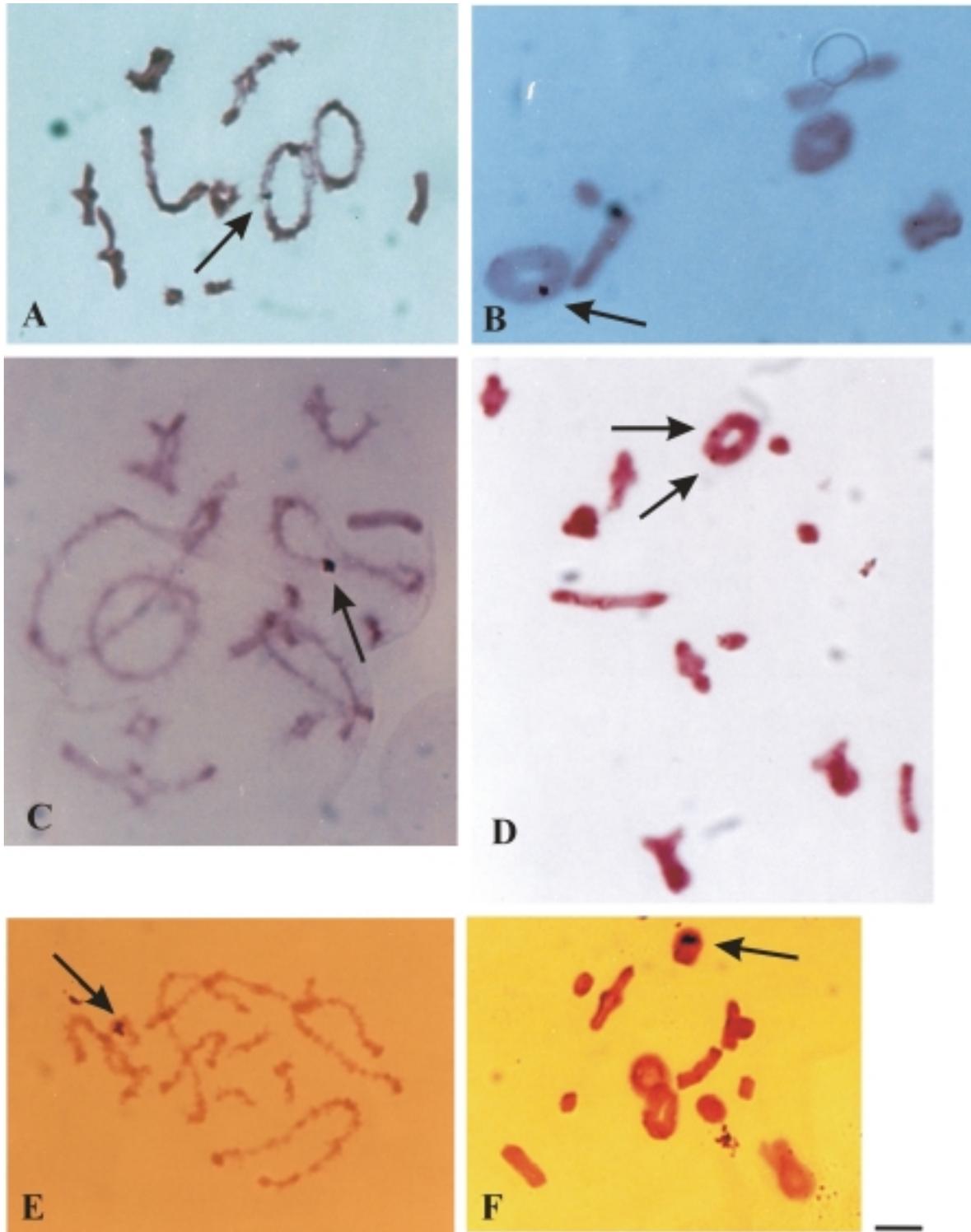


Figura 1. Marcações (setas) por hibridização *in situ* em cromossomos meióticos de *S. pallens*: localização do gene *Lys* no cromossomo G_1 em células na fase de diplóteno (A) e metáfase I (B), localização do gene *Hsp70* no cromossomo G_2 em células em paquíteno (C) e metáfase I (D), localização do gene *Hsp83* no cromossomo M_7 em células em paquíteno (E) e metáfase I (F). Barra = 1 μ m.

Tabela 1. Número (N) e porcentagem (%) de marcações em cromossomos meióticos do gafanhoto *Schistocerca pallens* pelas sondas dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83*, através da técnica de PISH.

| GENE | Núcleos analisados | Núcleos marcados | | Cromossomos marcados | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|------------------|-------|----------------------|-------|----------------|-------|----|-------|----------------|-------|---|------|---|------|
| | | | | G ₁ | | G ₂ | | M* | | M ₇ | | P | | X | |
| | N | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| <i>Lys</i> | 167 | 108 | 64,67 | 102 | 94,44 | | | 09 | 8,33 | | | | | | |
| <i>Hsp70</i> | 313 | 199 | 63,57 | | | 179 | 89,94 | 38 | 19,09 | | | | | 1 | 0,50 |
| <i>Hsp83</i> | 211 | 163 | 77,25 | | | 35 | 21,47 | | | 159 | 97,54 | 2 | 1,22 | | |

* Cromossomo médio não identificado, não sendo necessariamente o mesmo para as duas hibridizações

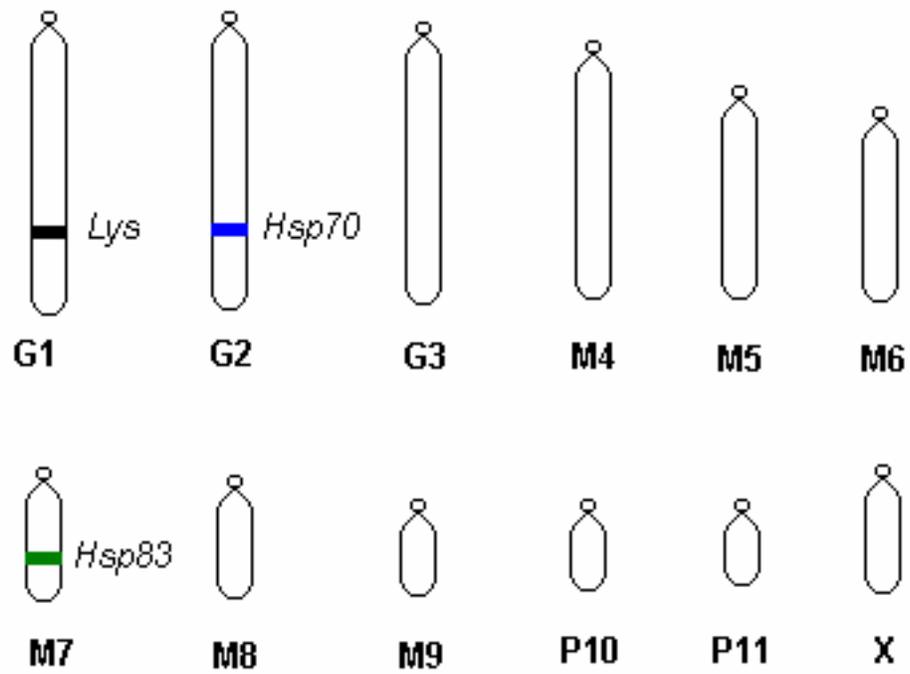


Figura 2. Idiograma do complemento cromossômico meiótico de *Schistocerca pallens*, mostrando a localização aproximada dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* mapeados.

Um número maior de marcações de lisozima em outros locais do genoma de *S. pallens* poderia ter sido obtido com a utilização de uma sonda com maior homologia, uma vez que a multiplicidade de locos de lisozima é comum em insetos, devido à sua importância na resposta de defesa contra microrganismos (Dafre e cols., 1994; Lee e cols., 1999; Fujita e cols., 2002). A lisozima é expressa em tecidos de cutícula e da epiderme, representando a primeira linha de defesa em insetos que se alimentam de microrganismos decompositores (Lemos e Terra, 1991; Lemos e cols., 1993; Ito e cols., 1995; Lee e cols., 1999; Fujita e cols., 2002), ou de ataques de fungos, como os utilizados em programas de controle biológico (Bateman e cols., 1993; Gillespie e cols., 1998). A marcação em apenas dois locos cromossômicos em *S. pallens* pode ser devida à baixa especificidade da sonda heteróloga de lisozima humana, em relação às seqüências de nucleotídios do gene de ortópteros, apesar da redução da stringência, pela diminuição de 50% para 30% de formamida empregada neste trabalho.

Um aspecto do controle biológico das espécies de gafanhotos pragas é o mecanismo de susceptibilidade aos fungos utilizados como agentes controladores (Bateman e cols., 1993; Gillespie e cols., 1998). Em *S. gregaria* a resposta imunológica está associada à resistência ao fungo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, através da formação de nódulos de hemócitos agregados, levando à melanização local pela atividade da enzima fenoloxidase (Gillespie e cols., 2000). Esta enzima é produzida como profenoloxidase e convertida na forma ativa pela lisozima, que desta forma também está implicada na resposta imunológica dos insetos (Gillespie e cols., 1998). Devido ao importante papel da lisozima na resposta imunológica a microrganismos invasores, genes para esta enzima já foram clonados de diversos insetos, incluindo *D. melanogaster*, *Musca domestica*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Bombix mori* e *Hyalophora cecropia* (Hultmark, 1993; Dafre e cols., 1994; Kang e cols., 1996; Gao e Fallon, 2000). Em gafanhotos, entretanto, em que é grande sua importância devido à implicação na resistência ao controle biológico por microrganismos, ainda não foram clonados genes para lisozima, nem mesmo para as espécies em que a expressão da fenoloxidase foi caracterizada, como *L. migratoria* (Simonet e cols., 2002b) e *S. gregaria* (Gillespie e cols., 2000).

O gene *HSP70* de *S. pallens* foi localizado no cromossomo **G₂**, sendo possível que as marcações secundárias observadas em um cromossomo médio não identificado também representem um segundo loco desta hsp. Alguns genes de resposta ao choque térmico têm múltiplos locos, como *HSP70*, para o qual foram identificados um agrupamento de três locos na seção 87C1 e dois na 87A7 em *D. melanogaster* (Livak e cols., 1978; Vazquez e cols., 1993). Utilizando a mesma sonda empregada neste trabalho, Bonorino e cols. (1993) localizaram o gene *HSP70* em várias espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*, que também ocorre em agrupamento único ou em agrupamentos próximos. Em cromossomos politênicos do mosquito *Anopheles albimanus* foram localizados por hibridização *in situ*, com sondas de *D. melanogaster*, locos de *Hsp70* nas posições 11C e 13C no braço cromossômico **2R** (Benedict e cols., 1993).

O gene *HSP83* foi mapeado em um cromossomo médio identificado como **M₇**, ocorrendo também marca secundária no cromossomo **G₂**, que pode representar um segundo loco desta hsp ou uma cognata em *S. pallens*. Em *D. melanogaster* ocorrem dois locos de hsp90, *HSP83* e *HSR ω* , na seção 93D do braço cromossômico 3L (Holmgren e cols., 1981). Em uma comparação de seis espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*, utilizando também as mesmas sondas deste trabalho, Rieger (1999) demonstrou a existência de um único loco do gene *HSP83* no braço cromossômico **XR**, com exceção de *D. insularis*, que apresentou um loco adicional autossômico no braço **IIR**. Na mesma comparação o gene *HSR ω* foi mapeado na seção 94A do cromossomo **III** em *D. willistoni*.

A importância da resposta ao choque térmico é demonstrada pela ampla distribuição do fenômeno em todas as espécies investigadas e pela alta conservação dos genes entre espécies tão distintas como *D. melanogaster* e o homem (Becker e Craig, 1994; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000). As proteínas de resposta ao choque térmico são produzidas também em resposta a outros estresses, como os decorrentes de anóxia, álcool, selênio e metais pesados, drogas como a benzamida e colchicina e doenças, de forma que estes locos teriam um papel mais geral nas defesas do organismo (Santos e cols., 1993; Welch, 1993; Goto e Kimura, 1998; Kiang e Tsokos, 1998; Santoro, 2000).

Além das marcações principais, ocorreram marcações secundárias, abaixo do critério mínimo de 30%, para os três genes hibridizados. Tanto *Lys* quanto *Hsp70* apresentaram marcação em um cromossomo **M**, que não é necessariamente o mesmo

autossomo. Uma hibridização simultânea com as duas sondas (*Lys* e *Hsp70*) poderá esclarecer a situação. Também é interessante notar que as marcações principais de *Hsp70* ocorreram no cromossomo **G₂** e a de *Hsp83* no **M₇**, mas enquanto as marcações secundárias de *Hsp70* foram observadas em um cromossomo **M** não identificado, as de *Hsp83* foram no **G₂**, sendo tentador levantar a possibilidade de que estas marcas secundárias sejam resultado de hibridizações cruzadas, devidas à homologia parcial entre os dois genes. Embora não possa ser descartada, esta hipótese é pouco provável, pois a homologia entre os genes de diferentes famílias de *hsp* é baixa (Santoro, 2000).

O rápido progresso do projeto de seqüenciamento do genoma de *D. melanogaster* resultou da adoção de abordagens complementares, incluindo a disponibilidade de extensa quantidade de dados de mapeamento de genes (Adams e cols., 2000). Considerando que o genoma de ortópteros é mais de 50 vezes maior que o de drosofilídios (Hoy, 1994), embora sejam menos precisos devido ao reduzido tamanho dos cromossomos mitóticos e meióticos de *S. pallens* em relação aos politênicos interfásicos de *Drosophila*, os dados de localização física de genes que puderem ser obtidos serão ainda mais úteis para guiar um futuro programa de seqüenciamento genômico deste gafanhoto praga.

Agradecimentos: Agradecemos à Dra. Maria José de Souza (UFPE), pela contribuição ao longo de todas as etapas do trabalho e pelas valiosas sugestões ao texto. Este trabalho foi financiado pela agência CNPq (APq no. 478099/2001-0 e no. 420046/2001-1). T.T.R. foi bolsista do Programa DCR do CNPq, S.V.O.S. foi bolsista de mestrado do CNPq e I.A.P. foi bolsista do Programa PIBIC– UFPE/CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers Y-HC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Miklos GLG, Abril JF, Agbayani A, Na H-J, Andrews-

- Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei M-H, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshre A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, n-Kiamos IS, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang Z-Y, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh R-F, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Amedegnato C (1974) Les genres d'acridiens Neotropicaux leur classification par familles sous-familles et tribus. *Acrida* 3:93-203.
- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P (1999) Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 262:745-754.
- Avidos MFD, Ferreira LT (1997) Gafanhotos, a maldição milenar. *Biotec Ciênc Desenv* 2: 8-11.
- Barrientos LL (1995) The present state of the locust and grasshopper problem in Brazil. *J Orth Res* 4:61-64.
- Bateman R, Carey M, Moore D, Prior C (1993) The enhanced infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals Appl Biol* 122:145-152.
- Becker J, Craig EA (1994) Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219:11-23.
- Benedict MQ, Cockburn AF, Seawright JA (1993) The *Hsp70* heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Insect Mol Biol* 2:93-102.
- Bonorino CBC, Pereira M, Alonso CEV, Valente VLS, Abdelhay E (1993) *In situ* mapping of the *hsp70* locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Braz J Genet* 16:561-571.
- Bouaïchi A, Simpson J (2003) Density-dependent accumulation of phase characteristics in a natural population of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Physiol Entomol* 28: 25-31.

- Breuer M, Hoste B, De Loof A (2003) The endocrine control of phase transition: some new aspects. *Physiol Entomol* 28:3-10.
- Brown SE, Knudson DL (1997) FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insect Mol Biol* 6:197-202.
- Carbonell CS (1977) Origin evolution and distribution of the neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): a preliminary hypothesis. *Rev Soc Ent Argentina* 36:153-175.
- Dafre S, Kylden P, Samakovlis C, Hultmark D (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet* 242:152-162.
- Duranton JF, Launois M, Launois-Luong MH, Lecoq M (1987) Guia prático de luta contra os gafanhotos devastadores no Brasil. FAO, Roma-CIRAD/PRIFAS, Montpellier. 161p.
- Engels WR, Preston CR, Thompson P, Eggleston WB (1986) *In situ* hybridization to *Drosophila* salivary chromosomes with biotinylated DNA probes and alkaline phosphatase. *Focus* 8:6-8.
- Ferenz H-J, Seidelmann K (2003) Pheromones in relation to aggregation and reproduction in desert locusts. *Physiol Entomol* 28:11-18.
- Ferrier DE, Akam M (1996) Organization of the *Hox* gene cluster in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13024-13029
- Fujita A, Minamoto T, Shimizu I, Abe T (2002) Molecular cloning of lysozyme encoding cDNAs expressed in the salivary gland of a wood-feeding termite, *Reticulitermes speratus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1615-1624.
- Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002) *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Piracicaba. 920p.
- Gao Y, Fallon A M (2000) Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. *Insect Mol Biol* 9:553-558.
- Gillespie JP, Bateman R, Charnley A K (1998) Role of cuticle-degrading protease in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Invert Pathol* 71:128-137.
- Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK (2000) The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J Insect Physiol* 46:429-437.
- Goto SG, Kimura MT (1998) Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J Insect Physiol* 44: 1233-1239.
- Hägele BF, Simpson SJ (2000) The influence of mechanical, visual and contact chemical stimulation on the behavioural phase state of solitary desert locusts (*Schistocerca gregaria*). *J Insect Physiol* 46:1295-1301.
- Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R, Meselson M (1981) Sequence homologies in the 5' regions of *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3775-3778.
- Hoy MA (1994) *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. Academic Press, Inc. 546 pp.
- Hultmark D (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet* 9:178-183.

- Ito Y, Nakamura M., Hotani T, Imoto T (1995) Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J Biochem* 118:546–551.
- Janssen T, Claeys I, Simonet G, De Loof A, Girardie J, Vanden Broeck J (2001) cDNA cloning and transcript distribution of two different neuroparsin precursors in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol Biol* 10:183-189.
- Kang D, Romans P, Lee J-Y (1996) Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene* 174:239-244.
- Kelsh R, Dawson I, Akam M (1993) An analysis of *abdominal-B* expression in the locust *Schistocerca gregaria*. *Development* 117: 293-305.
- Kiang JG Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183-201.
- Kumar V, Collins FH (1994) A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosomes of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol Biol* 3: 41-47.
- Lee HS, Cho MY, Lee KM, Kwon TH, Lee BL (1999) The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Lett* 444:255-259.
- Lemos FJA, Ribeiro AF, Terra WR (1993) A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem Mol Biol* 23:533–541.
- Lemos FJA, Terra WR (1991) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp Biochem Physiol* 100B:265–268.
- Livak KJ, Freund R, Shweber M, Wensink PC, Meselson M (1978) Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 11:5613-5617.
- López-León MD, Vázquez P, Hewitt GM, Camacho JPM (1995) Cloning and sequence analysis of extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 75:370-375.
- Loreto V, Souza MJ (2000) Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) in *Belosacris coccineipes* (Acrididae, Leptysminae). *Genet Mol Biol* 23:575-579.
- Matheson T, Rogers SM, Krapp HG (2004) Plasticity in the visual system is correlated with a change in lifestyle of solitary and gregarious locusts. *J Neurophysiol* 91: 1-12.
- Mesa A, Ferreira A, Carbonell CS (1982) Cariologia de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. *Annls Soc Ent Fr (NS)* 18:507-526.
- Penner MP, Yerushalmi Y (1998) The physiology of locust phase polymorphism: an update. *J Insect Physiol* 44: 365-377.
- Picone D, Crescenzi O, Angeli S, Marchese S, Brandazza A, Ferrara L, Pelosi P, Scaloni A (2001) Bacterial expression and conformational analysis of a chemosensory protein from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 268:4794-4801.
- Procunier, WS, Smith JJ (1993) Localization of ribosomal DNA in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) by *in situ* hybridization. *Insect Mol Biol* 2:163-174.
- Rieger TT (1999) Mapeamento por hibridação *in situ* e expressão no desenvolvimento de genes de resposta a estresses e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni*

- de *Drosophila*. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 138 pp.
- Rocha MF, Souza MJ, Moura RC (2004) Karyotypic analysis, constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). *Caryologia* 57:107-116.
- Rogers SM, Matheson T, Despland E, Dodgson T, Burrows M, Simpson SJ (2003) Mechanosensory-induced behavioural gregarization in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Exp Biol* 206:3991-4002.
- Ruiz A, Ranz JM, Cáceres M, Segarra C, Navarro A, Barbadilla A. (1997) Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. *Braz J Genet* 20: 553-565.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 Vol.
- Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59:55-63.
- Santos JF, Lewgoy F, Valente VLS (1993) Heat shock puffs are induced by selenium in *Drosophila melanogaster*. *Dros Inf Sci* 72:145-146.
- Segarra C, Lozovskaya ER, Ribó G, Aguadé M, Hartl DL (1995) P₁ clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Chromosoma* 104: 129-136.
- Simonet G, Claeys I, November T, Wataleb S, Janssen T, Maes R, De Loof A, Vanden Broeck J (2002a) Cloning of two cDNAs encoding isoforms of a pacifastin-related precursor polypeptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: analysis of stage- and tissue-dependent expression. *Insect Mol Biol* 11: 353-360.
- Simonet G, Claeys I, Vanderperren H, November T, De Loof A, Vanden Broeck J (2002b) cDNA cloning of two different serine protease inhibitor precursors in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Mol Biol* 11: 249-256
- Souza MJ (1991) Two simple methods for the preparation of mitotic and meiotic chromosomes of Orthoptera. *Braz J Genet* 14:1079-1084.
- Steedman A (1990) Locust handbook, 3rd ed. Natural Resources Institute, Chatham.
- Tawfik AI, Sehnaal F (2003) A role for ecdysteroids in the phase polymorphism of the desert locust. *Physiol Entomol* 28:19-24.
- Tawfik AI, Treiblmayr K, Hassanali A, Osir EO (2000) Time-course haemolymph juvenile hormone titres in solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria*, and their relation to pheromone emission, CA volumetric changes and oocyte growth. *J Insect Physiol* 46:1143-1150.
- Tawfik AL, Mohammed MM (1997) Ultrastructure of the corpus allatum in the solitary and gregarious adult male, *Schistocerca gregaria* in relation to pheromone production. *Bulletin of the Faculty of Science, Assiut University* 26:1-18.
- Tear G, Akan M, Martinez-Arias A (1990) Isolation of an *abdominal-A* gene from the locust *Schistocerca gregaria* and its expression during early embryogenesis. *Development* 110: 915-926.
- Vanden Broeck J, Chiou S-J, Schoofs L, Hamdaoui A, Vandenbussche F, Simonet G, Wataleb S, De Loof A (1998) Cloning of two cDNAs encoding three small serine protease inhibiting peptides from the desert locust *Schistocerca gregaria* and analysis of tissue-dependent and stage-dependent expression. *Eur J Biochem* 254:90-95.

- Vazquez J, Pauli D, Tissières A (1993) Transcriptional regulation in *Drosophila melanogaster* during heat shock: a nuclear run-on analysis. *Chromosoma* 102:233-248.
- Welch WJ (1993) How cells respond to stress. *Sci Amer* 268:34-41.
- Wu Q Andolfato P Haunerland NH (2001) Cloning and sequencing of the gene encoding the muscle fatty acid binding protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol* 31:553-562.
- Zahler PM (1987) Agricultura vs ecologia no combate ao gafanhoto *Rhammatocerus* sp. *Ciênc Cult* 39: 703-706.

IV. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões sobre a localização dos genes *Lys*, *Hsp70* e *Hsp83* no gafanhoto *S. pallens*:

1. O gene da lisozima foi localizado no maior autossomo da espécie (**G₁**), utilizando como sonda o gene de lisozima humana, com a possibilidade de existir um loco adicional em um cromossomo **M**;
2. O gene *Hsp70* foi localizado no par cromossômico **G₂**, que possivelmente representa o principal agrupamento deste gene na espécie, mas mostrando outro loco com similaridade em um cromossomo **M**;
3. O gene *Hsp83* foi localizado em um par cromossômico de tamanho médio, identificado como **M₇**, apresentando também outro loco com similaridade no cromossomo **G₂**;
4. A alta frequência de sinais de hibridização observados com as sondas dos três genes mostrou o elevado grau de homologia das seqüências entre os genes *Lys* do homem e de *S. pallens* e entre os genes *Hsp70* e *Hsp83* de *D. melanogaster* e *S. pallens*;
5. Estes são os primeiros genes de seqüência única de *S. pallens* localizados cromossomicamente. Localizações cromossômicas de genes de resposta a estresse e outros genes por PISH representam marcadores importantes para o mapeamento do genoma de *S. pallens* que estamos realizando.

VI. ABSTRACT

ABSTRACT

Some grasshopper species are historically known as insect pest of crops and native pastures around the world, which cause ecological and economical damages amounting to millions of dollars as swarms march. The main pest species are *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*, and, in the case of Brazil, the most prominent are *S. pallens*, *Rhammatocerus schistocercoides* and *Stiphra robusta*. There is a vast genetic literature concerning *L. migratoria* and *S. gregaria* but almost none on the species which are important pests in Brazil. This work begins the genetic characterization of *S. pallens* by mapping the single copy genes *Lys*, *Hsp70* and *Hsp83* by permanent *in situ* hybridization (PISH). Were analysed almost 700 nuclei for the three genes, achieving a mean of 68,49% of hybridization signals. The analysis of 167 nuclei with *Lys* hybridization signals revealed that 94,44% of marks laid on **G₁** chromosome, the species major autosome. The gene *Hsp70* was assigned to **G₂** chromosome, where were observed 89,94% of marks in the total of 199 marked nuclei. For the *Hsp83* gene 163 marked nuclei were found, from which 97,54% of marks were observed in a medium sized chromosome, tentatively identified as the **M₇**. All the three genes have presented also secondary hybridization signals, always under 30% frequency. These are the first single copy genes mapped for *S. pallens* and also for the Acrididae family. These data are useful as new landmarks for chromosome individualization and also as physical marks to guide an eventual genome sequencing programme for *S. pallens*.

VII. ANEXO

ANEXO

O cariótipo de *Schistocerca pallens* (Fig. 1) complementado por dados de bandas C e localização das regiões organizadoras do nucléolo será descrito por SOUZA (comunicação pessoal) em manuscrito em preparação.

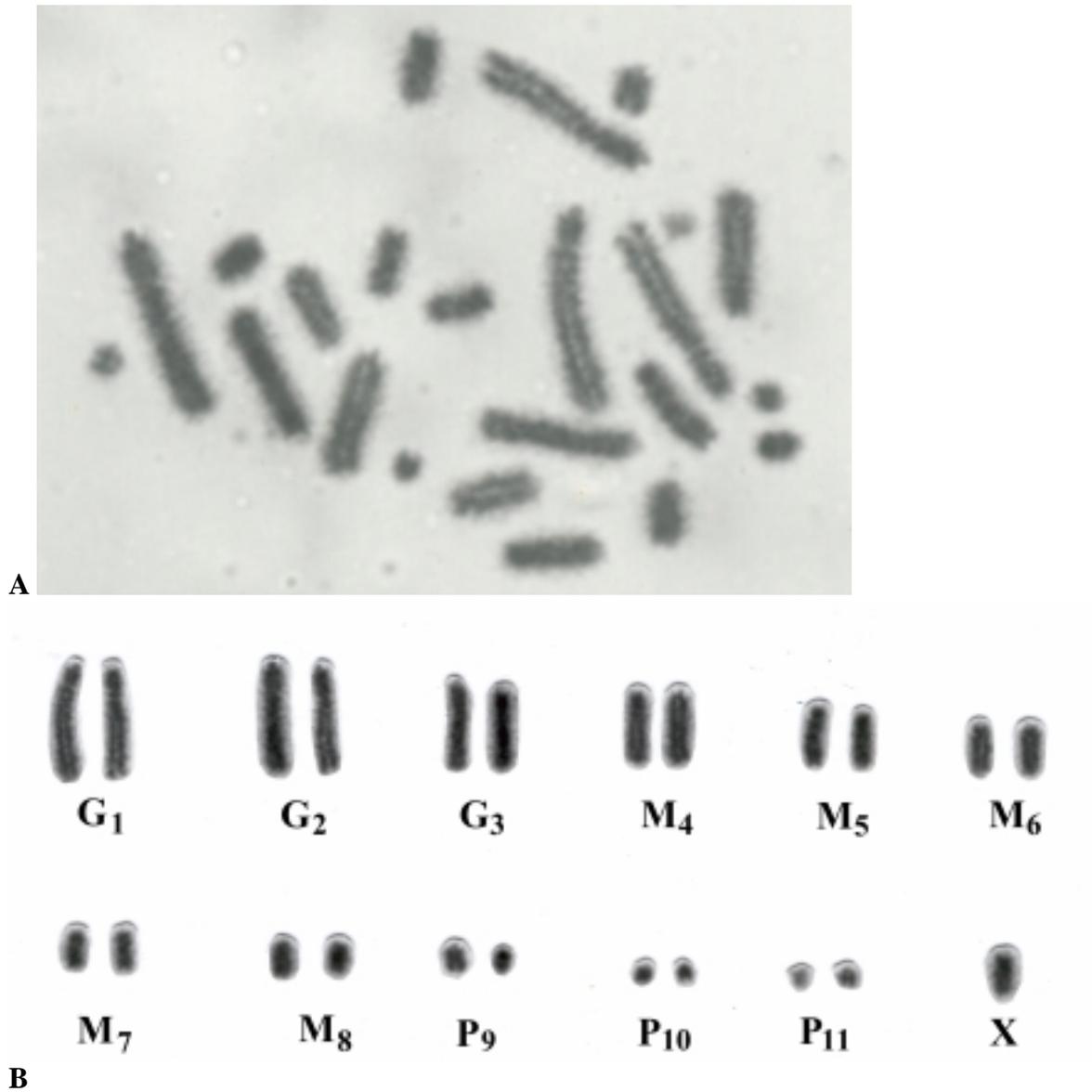


Figura VII.1. Metáfase mitótica (A) e cariótipo (B) de *Schistocerca pallens* (fotografia cedida pela Dra. Maria José de Souza, UFPE).

As coletas de indivíduos adultos de *Schistocerca pallens*, incluindo os espécimes estudados neste trabalho, foram realizadas em diversas localidades do Estado de Pernambuco, conforme mostrado no mapa da Figura 2 e na Tabela 1.



Figura VII. 2. Mapa do Estado de Pernambuco com a indicação dos locais de coleta (●) dos espécimes de *Schistocerca pallens*.

Tabela VII.1. Número de espécimes do gafanhoto *Schistocerca pallens* coletados durante o período de 2001 até 2003 com as coordenadas geográficas dos locais de coleta.

| Local | Coordenadas | Nº espécimes |
|--------------|-----------------------------------|---------------------|
| Itamaracá | 7°41' e 7°49'S e 34°49' e 34°54'W | 28 |
| Pombos | 8°09' 16,6''S e 35°25'15,1''W | 5 |
| Pesqueira | 8°18'45''S e 36°41'15''W | 12 |
| Bezerros | 08°11'15''S e 35°48'45''W | 20 |
| Toritama | 8°03'45''S e 36°03'45''W | 4 |
| Bonito | 8°26'15''S e 35°41'15''W | 9 |
| Total | | 78 |