

## Um caso raro de triploidia natural na mosca-das-frutas *Anastrepha obliqua*

Inês de Araújo Moura<sup>1</sup>, Wagner Franco Molina<sup>2</sup>, Francisco Pepino de Macedo<sup>3</sup>

1. Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: ines\_rcunha@cri.gov.br

2. Doutor em Genética e Evolução (Universidade Federal de São Carlos), Professor Associado II da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, vinculado aos Programas de Pós-graduação em Sistemática e Evolução e Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Brasil. E-mail: molinawf@yahoo.com.br

3. Doutor em Genética (Universidade de São Paulo), Chefe do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: pepino\_macedo@ufrnet.br

**RESUMO:** Triploidia decorrente da não disjunção meiótica são eventos incomuns em Diptera. Análises citogenéticas desenvolvidas em uma população da mosca-das-frutas *Anastrepha obliqua*, oriunda do Estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil identificaram a ocorrência de um indivíduo triploide. Este é o primeiro caso descrito de triploidia no gênero *Anastrepha*. Larvas de *A. obliqua* foram obtidas a partir de frutos de *Spondias purpurea* (ciriguela). *A. obliqua* apresenta um valor diploide  $2n=12$ , presente em 29 espécimes, enquanto o indivíduo triploide apresentou  $3n=18$ . O espécime apresenta três sítios Ag-RONs e uma variação de um a três nucléolos em núcleos interfásicos, ao contrário dos dois sítios nos diploides. No gênero *Anastrepha*, triploidia natural demonstra ser um evento raro e aparentemente sem significado evolutivo para a espécie *A. obliqua*.

**Palavras-chave:** Tephritidae, citogenética de insetos, poliploidia, Nordeste do Brasil.

### A rare case of spontaneous triploidy in fruit fly *Anastrepha obliqua*

**ABSTRACT:** Triploidy due to meiotic nondisjunction is a rare event in Diptera. Cytogenetic analyses performed in a population of fruit flies *Anastrepha obliqua* from the state of Rio Grande do Norte, northeast of Brazil, identified the occurrence of one triploid individual. This is the first case of triploidy described in the *Anastrepha* genus. Samples of *A. obliqua* larvae were obtained from *Spondias purpurea* (red mombin) fruits. *A. obliqua* presents a diploid value of  $2n=12$  observed in 29 specimens, whereas a triploid individual presented  $3n=18$ . The triploid specimen showed three AgNOR sites and a variation from one to three nucleoli in interphase nuclei, in contrast to the two sites in the diploids. In *Anastrepha*, natural triploidy is proving to be a rare event and apparently holds no evolutionary significance to the species *A. obliqua*.

**Keywords:** Tephritidae, insect cytogenetics, polyploidy, Northeastern Brazil.

### 1. Introdução

A família Tephritidae apresenta um número diploide  $2n=12$ , que se mostra conservado para a maioria das espécies citologicamente estudadas (SOLFERINI; MORGANTE, 1987, 1990; MORGANTE et al., 1993; ZHAO et al., 1998; SELIVON et al., 2000).

A triploidia pode se originar de um erro meiótico decorrente de não disjunção cromossômica, ou de endomitose em uma célula precursora da meiose. Nos dois casos serão produzidos gametas  $2n$ , que quando fecundados por gametas haploides normais originam indivíduos triploides (GUERRA, 1988).

Nas espécies que se reproduzem por partenogênese é mais comum acontecer casos de triploidia (WHITE, 1977). Ao contrário, em espécies dioicas cujo processo reprodutivo depende da singamia gamética, a triploidia é um fenômeno menos esperado e aparece ocasionalmente nas populações (CUELLAR; UYENO, 1972; GOLD; AVISE, 1976; OJIMA; TAKAI, 1979; MORELLI et al., 1983). De fato, nos dípteros, a triploidia decorrente da não disjunção meiótica é pouco comum. Entre os poucos casos descritos foi relatada em *Stegopterna mutata* (MALLOCH, 1914) (Simuliidae), espécie triploide partenogenética, sem machos (CURRIE; HUNTER, 2003), que faz parte de um

complexo de espécies crípticas com número cromossômico triploide (MARTIN et al., 1994).

A primeira descrição de ocorrência de triploidia natural em *A. obliqua* sugere questões evolutivas e ambientais para a espécie, cuja extensão biológica ainda é em grande parte desconhecida.

### 2. Material e Métodos

Larvas de 29 indivíduos de *A. obliqua* foram coletadas em amostras de frutos de *Spondias purpurea* do município de Ceará-Mirim ( $5^{\circ}43'21''S$ ,  $35^{\circ}22'1''O$ ), estado do Rio Grande do Norte, região nordeste do Brasil. Preparações cromossômicas foram obtidas a partir de gânglios cerebrais e os discos imarginais de larvas de terceiro instar (SELIVON; PERONDINI, 1997). Para a espécie foram analisadas de 16 a 30 indivíduos de ambos os sexos. Os cromossomos foram corados com solução do corante Giemsa à 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8. As regiões organizadoras de nucléolos foram visualizadas de acordo com a técnica de impregnação argêntea preconizada por HOWELL e BLACK (1980). As análises cromossômicas foram realizadas em microscópio ótico com aumento de 1.000 vezes.

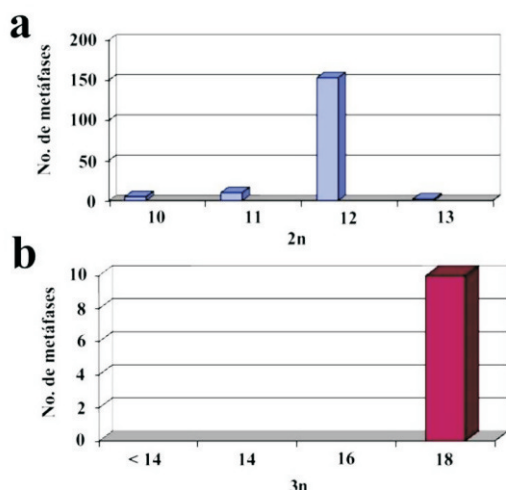
As melhores metáfases foram fotografadas em

fotomicroscópio Olympus BX 50, com sistema digital de captura de imagens Olympus DP-70. A classificação dos cromossomos seguir a nomenclatura preconizada por LEVAN et al. (1964).

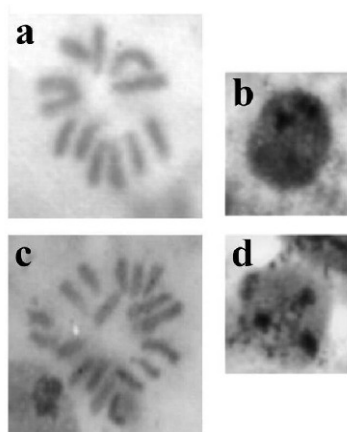
### 3. Resultados

Um total de 28 indivíduos de *A. obliqua* apresentou um cariótipo composto por  $2n=12$ , acrocêntricos (NF=12) (Figura 1a e 2a).

Um único indivíduo se revelou triploide com  $3n=18$  (Figura 2). Este indivíduo apresentou uma constituição triploide em todas as metáfases analisadas (Figura 1b). Enquanto os diploides exibiram os dois maiores cromossomos marcados pela prata, na região próxima ao centrômero, e até dois nucléolos por núcleo diploide (Figura 2b), no indivíduo triploide, três cromossomos portavam sítios ribossomais ativos. Neste indivíduo, os núcleos interfásicos submetidos à técnica de Ag-RONs apresentaram coloração castanha escuro, tamanho uniforme e uma variação de um a três nucléolos (Figura 3b), sendo 34,4% com uma ou duas marcações e 30,4% com três marcações, que confirma a presença em triplicata das regiões organizadoras de nucléolos.



**Figura 1.** Frequência de números cromossômicos em indivíduos diploides ( $2n=12$ ) (a) e em um indivíduo triploide ( $2n=18$ ) de *A. obliqua* (b).



**Figura 2.** Metáfase somática de *A. obliqua* ( $2n=12$ ) (a) e do triploide ( $3n=18$ ). Em (b) e (d), dois e três nucléolos são identificados, respectivamente, em núcleos interfásicos diploide e triploide, através da técnica de Ag-RONs.

### 4. Discussão

A poliploidia é importante na evolução genômica, particularmente nas plantas. Estima-se que 30-35% das plantas com flores são poliploides recentes, e entre 70-80% tenham sofrido eventos de poliploidia durante sua história evolucionária (STEBBINS, 1971). A poliploidia é relativamente rara em animais e é frequentemente associada com a reprodução assexuada. É evidente que o entendimento da importância evolucionária da poliploidia em alguns grupos animais ainda depende de mais amplos estudos.

Insetos que se reproduzem através da partenogênese são em geral poliploides. Na espécie *weevil*, *Otiorhynchus scaber* (LINNAEUS, 1758), três constituições cromossômicas são encontradas. Diploides que se reproduzem de forma sexuada e dois tipos poliploides que se reproduzem através partenogênese. Esta espécie é um exemplo clássico de partenogênese geográfica (SUOMALAINEN et al., 1987) em que a forma sexual diploide habita a área central circundada por uma zona ocupada por formas partenogênicas, que são poliploides (BRAUN, 1992). Essa triploidia partenogênica provavelmente surgiu da fertilização de ovos diploide ou triploide (STENBERG et al., 2000).

Em formigas verifica-se que o tamanho do genoma é quase constante e há uma tendência geral de cariótipos com baixo número cromossômico de apresentarem cromossomos de tamanho grande e vice-versa (CROZIER, 1975). Sugerindo, portanto, que rearranjos Robertsonianos (fissão cêntrica) ao invés de poliploidia, sejam os principais mecanismos de mudanças cromossômicas numéricas. Isto de fato parece verdadeiro, tendo em vista que se essa diversificação fosse resultado de poliploidização, seria esperada pouca ou nenhuma correlação entre o comprimento médio e o número cromossômico (IMAL et al., 1977).

Em uma população da formiga *Solenopsis invicta* um alto nível de triploidia em fêmeas não-reprodutivas, parece ser decorrente de um alto nível de produção de espermatozoides diploides nos machos (KRIEGER et al., 1999). Poliploidia podem estar na base da diversificação cariotípica em abelhas que mostram uma variação de 8 a 25 cromossomos no número haploide. Acredita-se que o número haploide ancestral seja  $n=8$  e que mudanças ocorridas no cariótipo, sejam estruturais ou numéricas, foram induzidas primariamente por mecanismos de poliploidia e secundariamente por arranjos Robertsonianos, dependendo do valor adaptativo que tais mudanças conferiram às espécies (TARELHO, 1973).

Desde estudos clássicos, acumulam-se evidências de que os sítios Ag-NORs podem variar quanto à distribuição, número e atividade gênica (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Sítios ribossomais podem estar localizados em apenas um ou em muitos pares cromossômicos. Nem sempre restritos às constrições secundárias, podem estar localizados junto

podem estar localizados junto aos centrômeros ou telômeros dos cromossomos, constituindo em importante marcador citotaxonômico e filogenético entre espécies. Em insetos, as NORs podem estar localizadas em cromossomos autossômicos, como no gafanhoto *Radacridium nordestinum* (Romaleidae) (ROCHA et al., 1997) ou também a cromossomos sexuais (RUFAS et al., 1985). A presença de NORs em *A. obliqua* é exclusiva sobre o primeiro par autossômico, e não nos sexuais como acontece na maioria das espécies.

A presente identificação de triploidia natural em *A. obliqua* amplia a extensão deste fenômeno, cuja singularidade e características estocásticas sugerem um papel menos destacado na evolução cromossômica da família Tephritidae.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a FINEP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e a Dr. Denise Selivon pela identificação taxonômica dos espécimes.

## 6. Referências Bibliográficas

- BAIMAI, V.; TRINACHARTVANIT, W.; TIGRVATTANANONT, S.; GROTE, P. J.; PORAMARCOM, R.; KYCHALAO, U. Metaphase Karyotypes of fruit flies of Thailand. I. Five sibling species of the *Bactrocera dorsalis* complex. **Genome**, v. 38, p. 1015-1022, 1995.
- BRAUN, W. Über zweigeschlechtliche und parthenogenetische Formen des *Otiiorhynchus scaber* L. (Coleoptera, Curculionidae). **Entomologische Blaetter fuer Biologie und Systematik der Kaefer**, v. 88, p. 76-82, 1992.
- CROZIER, R. H. Hymenoptera. In: JOHN, B. (ed.). *Animal Cytogenetics*. Berlin: Gebrudeer Borneträeger, (**Insecta**, 7) v. 3, 95p, 1975.
- CUELLAR, O.; UYENO, T. Triploidy in rainbow trout. **Cytogenetics**, v. 11, p. 508-515, 1972.
- CURRIE, D. C.; HUNTER, F. F. A new species of *Stegopterna* Enderlein, and its relationship to the allotriploid species *St. mutata* (Malloch, 1914) (Diptera: Simuliidae). **Zootaxa**, v. 214, p. 1-11, 2003.
- GOLD, J. R.; AVISE, J. C. Spontaneous triploidy in California roach *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 17, p. 144-149, 1976.
- GUERRA, M. Introdução à citogenética Geral. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 142p, 1988.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- IMAI, H. T.; CROZIER, R. H.; TAYLOR, R. W. Karyotype evolution in Australian ants. **Chromosoma**, v. 59, p. 341-393, 1977.
- KRIEGER, M. J. B.; ROSS, K. G.; CHANG, C. W. Y.; KELLER, L. Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Heredity**, v. 82, p. 142-150, 1999.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDEBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Heredity**, v. 52, p. 201-220, 1964.
- MARTIN, F. R.; MCCREADIE, J. W.; COLBO, M. H. Effect of trap site, time of day, and meteorological factors on abundance of host-seeking mammalophilic black flies (Diptera, Simuliidae). **Canadian Entomologist**, v. 126, p. 283-289, 1994.
- MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astynax* (Pisces, Characidae) II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, p. 245-250, 1983.
- MORGANTE, J. S.; SELIVON, D.; SOLFERINI, V. N.; NASCIMENTO, A. S. Genetic and morfological differenciation in specialist species *Anastrepha pickeli* and *A. montei*, p 273-276. In: STECK, G. J.; MCPHERON, B. A. (ed.). **Fruit fly pest: a world assessment of their biology and management**. Delray Beach, FL: St. Lucie Press, 596p, 1996.
- OJIMA, Y.; TAKAI, A. The occurrence of spontaneous polyploid in the Japanese common Loach, *Misgurnus anguicaudatus*. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B. v. 55, p. 487-491, 1979.
- ROCHA, M. F.; SOUZA, M. J.; TASHIRO, T. Karyotype variability in the genus *Radacridium* (Orthoptera-Romaleidae). **Cytologia**, v. 62, p. 53-60, 1997.
- RUFAS, J. S.; ESPONDA, P.; GOSÁLVEZ, J. NOR and nucleolus in the spermatogenesis of acridoid grasshopper. **Genetica**, v. 66, p. 139-144, 1985.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Evaluation of techniques for C and ASG banding of the mitotic chromosomes of *Anastrepha* species (Diptera:Tephritidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 651-653, 1997.
- SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Caryologia**, v. 40, p. 229-241, 1987.
- SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S.  $X_1X_1X_2X_2 : X_1X_2Y$  mechanism of sex determination in *Anastrepha bistrigata* and *A. serpentina* (Diptera:Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, p. 201-208, 1990.
- STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley, 216 p, 1971.
- STENBERG, P.; TERHIVUO, J.; LOKKI, J.; SAURA, A. Clone diversity in the polyploid weevil *Otiiorhynchus scaber*. **Heredity**, v. 132, p. 137-142, 2000.
- SUOMALAINEN, E.; SAURA, A.; LOKKI, J. Cytology and evolution in parthenogenesis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.
- TARELHO, Z. V. S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. Ribeirão Preto, SP: FFCLRP-USP, 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1973.
- WHITE, M. J. D. Animal cytology and evolution. London: Cambridge University Press, 961p., 1977.
- ZHAO, J. T. Mitotic and polytene chromosome analyses in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera, Tephritidae). **Genome**, v. 41, p. 510-526, 1998.