



Universidade Estadual de Campinas

PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

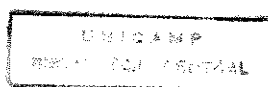
CITOGENÉTICA DE DÍPTEROS MUSCÓIDEOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Patricia Pasquali Parise
Maltempi
e aprovada pela Comissão Julgadora.
02/09/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de Biologia Celular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Maria P. Avancini

1999



9919648

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	EX.
TOMBO BC/39397	
PROC. 229,99	
C ☐	D ☒
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 09/11/99	
N.º CPD	

CM-00136644-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Maltempi, Patricia Pasquali Parise

M298c – Citogenética de dípteros muscóideos/Patricia Pasquali
Parise Maltempi. Campinas, SP:[s.n.], 1999.
74f.:ilus.

Orientadora: Rita Maria Pereira Avancini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

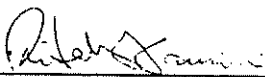
1. Dípteros. 2. Cromossomos sexuais. 3. Heterocromatina.
I. Avancini, Rita Maria Pereira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 02/09/99

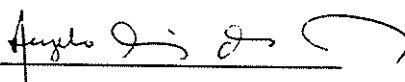
Banca Examinadora

Titulares:

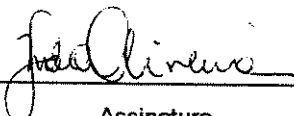
Profa. Dra. Rita Maria Pereira Avancini
(orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Pires do Prado


Assinatura

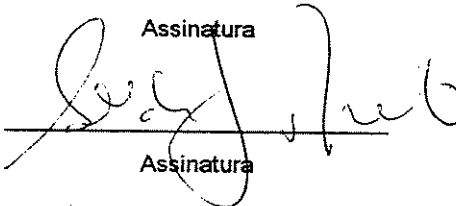
Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira


Assinatura

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel


Assinatura

Profa. Dra. Silvia das Graças Pompolo


Assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Assinatura

Profa. Dra. Doralice Maria Cella

Assinatura

Dedico este trabalho aos queridos orientadores
da minha vida científica,

Rita Avancini e Sebastião Taboga

AGRADECIMENTOS

-À orientadora e amiga Profa. Dra. Rita Avancini, pela orientação, paciência, incentivo, muitas oportunidades, e por sua preocupação com minha formação acadêmica e científica.

-Às Profas. Dras. Doralice M. Cella, Maria Tercília V. de Azeredo-Oliveira e Silvia das Graças Pompolo, pelas sugestões na análise prévia da tese.

-À Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel, pela ajuda em muitas etapas do trabalho, sugestões, e por me conceder livre acesso ao seu laboratório, materiais e equipamentos.

-Ao Prof. Dr. Angelo P. Prado, pela ajuda na classificação das espécies e pelos valiosos comentários sobre os Dípteros Muscóideos.

-Ao amigo e companheiro de laboratório Guido Tirone, pela ajuda na criação e coleta das moscas, e pelo apoio nos momentos difíceis que passamos juntos.

-À querida Luciana Bolsoni, minha companheira de hibridações, por sua disposição em sempre me ajudar e pelos momentos de discussões super valiosos para mim.

-À Maria A. Ferreira, pelo fornecimento das larvas de *Musca domestica*.

-Aos secretários do Depto. de Biologia Celular: Sidnei, pela ajuda na compra de materiais, e Liliam por sua eficiente ajuda em muitas etapas do trabalho.

-Ao Prof. Dr. Hernandez F. Carvalho, pelo uso do microscópio de fluorescência.

-A Profa. Dra. Catia M. Patiu, pelas informações sobre taxonomia e distribuição geográfica de Sarcophagidae.

-Ao Prof. Stephen Hyslop, pela revisão dos textos em inglês.

-À CAPES pela concessão da bolsa, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

-Aos professores, funcionários e alunos dos Deptos de Biologia Celular e Parasitologia que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento da tese.

-Ao Marcus pelo apoio, incentivo, companhia em noites e finais de semana no laboratório, paciência, e por toda ajuda em muitas das etapas do trabalho.

-Ao Renan, por ser um bebê muito bonzinho, tornando assim possível a finalização da escrita da tese.

ÍNDICE

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cromossomos sexuais e determinação do sexo	1
1.2. Bandamento cromossômico	10
1.2.1. Bandas Heterocromáticas	11
1.2.2. Hibridação <i>in situ</i> X NOR	13
1.3. Dípteros Muscóideos	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Justificativa	17
2.2. Objetivos gerais	18
3. TRABALHOS	19
• Sex chromosome variation among Muscidae flies	20
• C-banding and FISH in chromosomes of the blowflies <i>Chrysomya megacephala</i> and <i>C. putoria</i> (Diptera, Calliphoridae)	42
• Cytogenetics of the Neotropical Fleshfly <i>Pattonella intermutans</i> (Diptera, Sarcophagidae)	63
4. CONCLUSÕES GERAIS	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

RESUMO

O número modal de cromossomos entre os Dípteros Muscóideos é $2n=12$, sendo cinco autossomos e um par de cromossomos sexuais geralmente heteromórficos. No entanto, já foram descritas algumas espécies, todas pertencentes à família Muscidae, apresentando apenas cinco pares de cromossomos. Examinamos algumas espécies de Muscidae pertencentes a diferentes subfamílias, além de espécies de outras famílias a ela relacionadas, como Calliphoridae e Sarcophagidae, quanto à presença ou não do par heteromórfico, na tentativa de corroborar a hipótese de perdas independentes nos diferentes grupos. Além disso, uma vez que parece haver uma relação de NORs e /ou regiões heterocromáticas bandas C positivas com cromossomos sexuais, identificamos estas duas regiões cromossômicas através de bandamento C e hibridação *in situ*, para localizar NOR.. Os cromossomos sexuais estão presentes nos Muscóideos *Ophyra chalcogaster* (subfamily Azeliinae), *Synthesiomyia nudiseta* (subfamília Reinwardtiinae), e *Musca domestica* (subfamília Muscinae); nos Califorídeos *Chrysomya putoria* e *C. megacephala* e no Sarcófagídeo *Pattonella intermutans*. As espécies *Muscina stabulans* (subfamília Reinwardtiinae) e *Haematobia irritans* (subfamília Muscinae) fazem parte dos Muscóideos considerados exceções. Há considerável diferença com relação ao tamanho dos cromossomos sexuais, que são muito pequenos em *O. chalcogaster*, médios em *M. domestica* e espécies de *Chrysomya* e muito grandes em *S. nudiseta* e *Pattonella intermutans*. A NOR está localizada no par II de *M. stabulans* e *M. domestica*, no par III de *S. nudiseta*, no par IV de *P. intermutans* e nos cromossomos sexuais de *C. putoria* e *C. megacephala*. Nas espécies onde as NORs estão localizadas nos autossomos (com exceção de *M. domestica*) há uma coincidência destas com bandas intercalares de heterocromatina constitutiva. Uma vez que NORs em dípteros estão normalmente associadas aos cromossomos sexuais, o fato de estarem localizadas nos autossomos de algumas espécies poderia ser interpretado como um passo intermediário na evolução cariotípica, onde algumas seqüências do genoma, no caso a NOR, poderiam ter mudado para os autossomos evitando danos no caso de rearranjos cromossômicos. Este estudo forneceu resultados interessantes que parecem concordar com a hipótese de que na evolução dos cromossomos sexuais dos diferentes grupos possam ter ocorrido perdas independentes destes cromossomos, e não uma origem comum a todos eles. As espécies da família Muscidae aparentemente estão num processo mais

adiantado na evolução dos cromossomos sexuais, apresentando grande variação de tamanho destes cromossomos entre diferentes espécies, encontrando-se desde cromossomos muito grandes até pequenos pontos, o que sugere que partes destes cromossomos foram se fundindo com os autossomos ou sendo perdidas. Além disto, os cromossomos sexuais são heterocromáticos em todas as espécies estudadas e a NOR está localizada nos autossomos. *Pattonella intermutans* possui grandes cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos e a NOR também está localizada nos autossomos. Já as espécies de Calliphoridae por nós estudadas, parecem estar em um processo intermediário, onde os cromossomos sexuais ainda não apresentam-se totalmente heterocromáticos e as NORs estão localizadas nestes cromossomos e não nos autossomos.

ABSTRACT

The chromosome modal number in Muscoidea Diptera is $2n=12$: five pairs of autosomes and one sex chromosome pair. Nevertheless, some species with $2n=10$ chromosomes have been described, all of them from the Muscidae family. We analyzed the karyotype of some species of Muscidae from different subfamilies, as well as some species from the related families, Calliphoridae and Sarcophagidae, for the presence or absence of heteromorphic chromosomes. Besides, once there is a relation between NOR(s) and heterochromatin with sex chromosomes, we also investigated these regions through FISH (fluorescent *in situ* hybridization) for NOR and C banding for heterochromatin localization. Sex chromosomes are present in the Muscidae species: *Ophyra chalcogaster* (subfamily Azeliinae), *Synthesiomyia nudiseta* (subfamily Reinwardtiinae), and *Musca domestica* (subfamily Muscinae); in the Calliphoridae flies: *Chrysomya putoria* and *C. megacephala*; and in the Sarcophagidae *Pattonella intermutans*. *Muscina stabulans* (subfamily Reinwardtiinae) and *Haematobia irritans* (Subfamily Muscinae) are exceptions among Muscidae, since they lack sex chromosomes. There is a considerable variation on the length of sex chromosomes among the different species. Sex chromosomes are very short in *O. chalcogaster*, medium-sized in *M. domestica* and *Chrysomya* species and very long in *S. nudiseta* and *P. intermutans*. NOR is located on pair II of *Mu. stabulans* and *M. domestica*, on pair III of *S. nudiseta*, on pair IV of *P. intermutans* and on sex chromosomes of *C. putoria* and *C. megacephala*. There was a coincidence in the location of NOR and interstitial C bands in the species in which NORs are located in the autosomes (except *M. domestica*). Usually in Diptera NORs are associated with sex chromosomes, therefore NORs located in autosomes may suggest an intermediary step in the chromosome evolution of that group where some sequences of the genome, such as NOR(s), could be moved from sex to autosome chromosomes, avoiding serious damage to the genome if parts of sex chromosomes are lost. The Muscidae species apparently are in a more advance stage in the evolution of sex chromosome. There is a great variation in the length of sex chromosomes in the studied species, suggesting that parts of these chromosomes were lost or fused with the autosomes. Moreover, in all the Muscidae investigated the sex chromosomes are heterochromatic and NOR(s) are located in the autosomes. *Pattonella intermutans* has long sex chromosomes, that are totally heterochromatic and NOR is also located in the autosomes. The

Calliphoridae species studied in this work, seem to be in a intermediate stage, with NOR located in the sex chromosomes, which are not totally heterochromatic.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cromossomos sexuais e determinação do sexo

O interesse pelos mecanismos de determinação do sexo teve início por volta de 1900 com a redescoberta da genética Mendeliana. Nesta época foram realizados os primeiros estudos citológicos descrevendo os cromossomos sexuais (Revisão BULL, 1983).

Na maioria dos animais com mecanismos genéticos de determinação do sexo, os dois cromossomos que carregam estes genes diferem entre si pelo tamanho, pela forma e por propriedades de coloração. Nos mamíferos e em muitos insetos, machos normalmente possuem um par de cromossomos sexuais heteromórficos (XY), enquanto fêmeas mostram um par de cromossomos iguais (XX). Normalmente, mas nem sempre, o Y é menor que o X. Em aves e lepidópteros a situação é contrária: fêmeas possuem sexo heterogamético e freqüentemente têm cromossomos sexuais heteromórficos (ZW), enquanto que os machos apresentam um par de cromossomos morfologicamente idênticos (ZZ). Peixes, anfíbios, répteis e vários grupos de invertebrados apresentam ora machos ora fêmeas heterogaméticos, embora heterogametia nem sempre esteja acompanhada por cromossomos sexuais heteromórficos (Revisão BULL, 1983).

Onde os cromossomos sexuais são claramente heteromórficos, o cromossomo Y (ou W) tem poucos dos genes encontrados no cromossomo X (ou Z); são parcial ou totalmente heterocromáticos e mostram replicação tardia (Revisão JABLONKA & LAMB, 1990).

Nem todos os organismos com sexo separados têm cromossomos sexuais heteromórficos, e é encontrada uma variedade de espécies onde não é reconhecido morfologicamente qualquer cromossomo sexual. Há organismos com enormes modificações nos cromossomos sexuais, ou que apresentam mecanismos mais complexos envolvendo vários cromossomos (SUMNER, 1990).

O fato de alguns organismos não exibirem cromossomos sexuais, evidencia que estes cromossomos, por si, não são essenciais para a determinação do sexo, mas sim, que existem conteúdos gênicos específicos que estão relacionados com o sexo. Portanto, em alguns organismos, os genes ligados ao sexo estão localizados em

conspícuos cromossomos sexuais, enquanto que em outros, os genes ligados ao sexo estão abrigados nos autossomos. Por que existe tal diferença? Para responder a esta pergunta é necessário se conhecer os genes relacionados com a determinação do sexo, e nem sempre isto é uma tarefa fácil (ALBERTO, 1989).

A diferenciação dos cromossomos sexuais ocorre pela perda de recombinação entre os dois cromossomos, nos cromossomos inteiros ou, pelo menos, em um segmento. Diferenças entre seqüências homólogas nos dois cromossomos são sinais iniciais de diferenciação (TRAUT, 1994). Perda de função genética, invasão de transposons e blocos de replicação tardia (SCHEMPP & SCHMID, 1981; ITURRA & VELOSO, 1989) e bruscas mudanças morfológicas são formas de diferenciação (TRAUT, 1994) e caracterizam estágios avançados da evolução do Y e do W (BULL, 1983; CHARLESWORTH, 1991).

Porém, o heteromorfismo dos cromossomos X e Y (ou Z e W) parece não ser uma diferença primária entre autossomos e cromossomos sexuais: em uma série de organismos foi possível reconstruir a provável evolução dos cromossomos sexuais de elementos aparentemente iguais para aqueles claramente heteromórficos. Então, parece que o heteromorfismo é uma consequência, geralmente tardia, de especializações dos cromossomos sexuais (ALBERTO, 1989).

Parece claro para alguns autores que o heteromorfismo dos cromossomos sexuais tenha evoluído independentemente muitas vezes. A idéia mais aceita é que originalmente, em muitas linhagens, os cromossomos sexuais “ancestrais” foram morfológicamente idênticos. O sexo era determinado por um simples gene com dois alelos; a homozigosidade determinava o desenvolvimento de um sexo, enquanto a heterozigosidade conduzia a outro (DARLINGTON, 1958; OHNO, 1967; BULL, 1983).

De acordo com BULL (*Revisão*, 1983) e outros, a evolução das diferenças morfológicas entre cromossomos sexuais inicialmente homomórficos envolveu dois processos: (I) a supressão parcial ou completa de *crossing-over* entre os dois cromossomos homólogos nos sexos heterogaméticos (XY ou ZW), seguido por, (II) degeneração funcional do cromossomo Y (ou W).

As importantes consequências da supressão do *crossing-over* entre os cromossomos sexuais nos sexos heterogaméticos foram primeiro apontadas por

MULLER (1914; 1918). Ele sugeriu que, se não há crossing-over nos machos heterogaméticos, o cromossomo Y poderia acumular mutações deletérias recessivas pois não haveria oportunidade destas mutações tornarem-se homozigotas e serem eliminadas. BULL (*Revisão*, 1983) sugeriu que a hipótese mais plausível para explicar a situação descrita acima é que, se existem alelos ligados ao sexo que têm efeitos opostos sobre o *fitness* nos dois sexos, há uma vantagem seletiva na diminuição da recombinação entre os *loci* de determinação do sexo e estes genes.

Uma vez que a recombinação entre os cromossomos sexuais é reduzida em sexos heterogaméticos, há muitos mecanismos que poderão contribuir para a degeneração funcional do cromossomo Y (ou W). Por exemplo, foi sugerido que a recombinação desempenha importante papel no reparo de defeitos genéticos e epigenéticos no DNA, e na eliminação de DNA “selfish” da linhagem germinativa (BERNSTEIN, 1977; MARTIN, 1977; HOLLIDAY, 1984; BENGTSSON, 1985; ETTINGER, 1986). Então, mudanças na frequência de recombinação podem afetar a taxa de mutação e acumular DNA mutado. Se isto for verdade, a redução na frequência de recombinação nos sexos heterogaméticos poderia levar a um rápido acúmulo de mutações deletérias e danos no DNA do cromossomo Y (ou W) porque ele inteiro ou parte dele passa de geração para geração com oportunidade reduzida de reparo na recombinação.

TRAUT (1994) concluiu que o evento inicial da evolução dos cromossomos sexuais teria sido a própria aquisição da função de determinação do sexo. Outro requisito teria sido a ligação desta região com a sequência de determinação do sexo. Acredita-se que a evolução da supressão do *crossing* seja promovida por genes sexualmente antagônicos aos cromossomos sexuais (RICE, 1987). Como as trocas são suprimidas, os cromossomos X e Y (ou Z e W) evoluem separadamente, acumulando diferenças moleculares e estruturais. Sob a proteção da heterozigozidade nos sexos heterogaméticos, os genes do cromossomo Y (ou W) podem tornar-se inativos por mutações sem muita perda para o portador (MULLER, 1918). Uma vez que não há reparos através da recombinação, o processo não é reversível. Assim, além de tornar-se diferente, o cromossomo Y (ou W) tende a perder seu conteúdo de informações, por degeneração, com exceção de suas funções sexo-específicas como a determinação do sexo e/ou fertilidade (TRAUT, 1994).

São conhecidos alguns casos, tanto em vertebrados como em invertebrados, onde os cromossomos sexuais são morfologicamente indistinguíveis. Por exemplo, em algumas espécies de salamandras do gênero *Triturus*, que tem um sistema XY, as diferenças entre os cromossomos sexuais nas células somáticas pode(m) ser reconhecida(s) somente pela técnica específica para detectar heterocromatina constitutiva que revela mais heterocromatina no cromossomo Y. Do mesmo modo, na espécie de peixe *Poecilia sphenops*, o cromossomo W da fêmea é estruturalmente indistinguível do Z, mas tem um grande segmento terminal de heterocromatina (HAFF & SCHMID, 1984). HÄGELE (1985) mostrou que em *Chironomus thummi thummi* (Chironomidae), onde os cromossomos mitóticos são idênticos para ambos os sexos, uma das bandas nos cromossomos politênicos de machos é heterocromática. TROIANO (1988) demonstrou que em um outro díptero, *Clogmia albipunctata* (família Psychodidae) os cromossomos mitóticos dos machos são heterozigotos para bandas C que não são encontradas nas fêmeas.

Como discutido por JOHN (1988), não está claro se as diferenças conformacionais entre homólogos foram o primeiro passo na diferenciação dos cromossomos sexuais, ou se são consequências secundárias de algum outro evento iniciador, tal como supressão de recombinação ou um rearranjo. Bandas de heterocromatina constitutiva do tipo das descritas acima, estão normalmente associadas com a presença de seqüências altamente repetitivas que são consideradas como responsáveis por sua “coloração” diferencial (Revisão JABLONKA & LAMB, 1990). Mas, alguns autores acreditam que seqüências repetitivas são geralmente adquiridas após deterioração de uma região (CHARLESWORTH, 1978).

Segundo ALBERTO (1989) a incorporação da heterocromatina inerte pode representar um fenômeno inicial neste processo de especialização dos cromossomos sexuais. Como mostrado em alguns peixes, anfíbios e répteis, o ganho de heterocromatina constitutiva pode ser um passo intermediário no desenvolvimento de cromossomos sexuais completamente heteromórficos.

MULLER (1932) também propôs um modelo que diz que cromossomos sexuais morfologicamente distintos evoluíram a partir de autossomos homomórficos “normais”. OHNO (1967) e JOHN (1988) concordam com este autor e acreditam que o processo típico no caminho para o heteromorfismo sexual é a progressiva heterocromatinização de um dos dois cromossomos sexuais no sexo heterogamético.

O processo de heterocromatinização é também observado quando seqüências de origem autossômicas são translocadas para o cromossomo Y (STEINEMANN, 1982). Durante este processo de heterocromatinização, a seqüência original suporta mudanças drásticas, os genes degeneram-se em pseudogenes, a região cromossomal adquire vários tipos de elementos de transposição e segmentos do DNA são duplicados (STEINEMANN & STEINEMANN, 1992). No final deste processo um dos dois cromossomos sexuais pode tornar-se heterocromático, e os genes funcionais podem ser drasticamente reduzidos e em casos extremos os únicos genes que permanecem funcionais são aqueles envolvidos na fertilidade, como é o caso de *Drosophila* (Revisão HENNIG, 1986).

Existem casos de espécies animais onde o Y não é visível como entidade individualizada, tendo possivelmente sido perdido no curso da evolução; e esta perda pode ter ocorrido através de fusão com o X ou com algum autossomo. Em tais casos o número diplóide em um dos sexos é desigual, podendo-se assim, distinguir entre um tipo XY:XX com XO:XX (o O indicando a ausência de Y).

São conhecidos muitos casos onde o sistema de cromossomos sexuais XO:XX foi revertido para um XY:XX no curso da evolução. O caminho usual para esta transformação normalmente é através de fusões cêntricas entre um cromossomo X acrocêntrico da forma XO:XX e um autossomo acrocêntrico. Tais fusões criam um cromossomo denominado neo-X (WHITE, 1973).

Reversões evolucionárias deste tipo são bastante estudadas em gafanhotos, mas já foram observadas também em outros organismos e podem ser encontradas na maioria dos grupos onde ocorram cariótipos XO com X e autossomos acrocêntricos (WHITE, 1973).

Uma variedade de mecanismos de determinação do sexo ocorrem na ordem Diptera. Parece que em muitas ocasiões na filogenia desta ordem, um velho mecanismo de determinação de sexo é substituído por um inteiramente novo, freqüentemente incorporando um novo princípio genético (WHITE, 1973).

Os insetos da família Tipulidae, considerados um dos grupos mais primitivos de Diptera, em geral possuem cromossomos X e Y nos machos que não pareiam na meiose e são, conseqüentemente, univalentes na primeira metáfase (HENDERSON & PARSONS, 1963). *Dolichopeza albiceps*, *Tipula lateralis* e *T. marginata* têm

cromossomos sexuais grandes enquanto que em *T. flavolineata* os cromossomos X e Y são muito pequenos.

O mecanismo de determinação de sexo nas moscas Calliphoridae foi estudado por ÜLLERICH (1963). Todas as espécies por ele estudadas mostraram 6 pares de cromossomos, incluindo um pequeno par, parcial ou inteiramente heterocromático. Na maioria das espécies este par consiste de cromossomos X de tamanho igual nas fêmeas e de um par XY desigual nos machos. Em *Calliphora erythrocephala*, *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya rufifacies*, o pequeno par sexual consiste de elementos de tamanhos iguais em ambos os sexos. Em *Calliphora erythrocephala* este par perdeu suas funções de determinação de sexo que têm sido realizadas por um longo par, ou seja, um par que era outrora autossômico. A heterogametia dos machos é conservada e é incerto se a mudança consistiu na translocação de uma região determinadora do sexo ou na substituição de uma “velha” região de determinação do sexo por um “novo” locus. Nestes casos o cromossomo heterocromático de *C. erythrocephala* deve ser considerado como um ex-cromossomo sexual.

Normalmente nas linhagens de *M. domestica*, as fêmeas têm dois cromossomos X e os machos um X e um Y. Ocasionalmente, um X pode estar ausente nos dois sexos (fêmeas XO; machos YO) ou pode estar presente um X extra (fêmeas XXX; machos XXY); machos ou fêmeas com aneuploidias para o X são férteis de acordo com a presença ou ausência do cromossomo Y, respectivamente. Isto sugeria à época que o cromossomo Y determinaria machos enquanto que o X seria neutro (MILANI, 1975).

Nos últimos anos o mecanismo de determinação do sexo em populações naturais de *Musca domestica* tem sido extensivamente discutido. Prevalece a idéia do mecanismo heterogamético padrão, que envolve os cromossomos XY determinando macho (KERR, 1961; HIROYOSHI, 1964; MILANI *et al.*, 1967; WAGONER, 1969). Porém, já foram encontradas em algumas partes do mundo populações com mecanismos sexuais atípicos, onde tanto machos como fêmeas são XX e carregam fatores determinantes sexuais autossômicos masculinos (M) e algumas vezes femininos (F), fatores estes que podem estar em diferentes autossomos (WAGONER, 1969; RUBINI & FRANCO, 1972; HIROYOSHI & INOUE, 1979; TOMITA & WADA, 1989) ou no próprio cromossomo X (DENHOLM *et al.*, 1983;1985).

Estudos cariotípicos mostraram que em populações de várias partes da Europa, do Japão e algumas regiões da América do Norte, mecanismos autossômicos de determinação do sexo estão rapidamente sendo disseminados, substituindo, assim, o sistema heterossômico normal (fêmeas XX e machos XY) (FRANCO *et al.*, 1982). Estas pesquisas sugerem que os fatores M e F podem ser invasores recentes que estão competitivamente substituindo o mecanismo XY ancestral.

FRANCO e colaboradores (1982) mostraram que tanto o tipo como a frequência dos determinantes sexuais devem ser influenciados pelo clima, pela latitude e/ou altitude, mas o mecanismo como isto ocorre ainda é desconhecido.

TOMITA & WADA (1989) sugeriram que, de um modo geral, a variação geográfica no sistema de determinação do sexo em populações de *M. domestica* do Japão reflete o estado de transição causado por invasões de fatores determinantes autossômicos, mas a razão pela qual os genótipos não padrão são favorecidos pela seleção ainda é obscura.

O aparecimento dos fatores M e F é também relacionado com a evolução da resistência a inseticidas em *Musca domestica* (HIROYOSHI & FUKUMORI, 1978) ou como consequência da forte ligação com genes de resistência (FRANCO *et al.*, 1982; BULL, 1983). Esta situação é sugerida pela relação entre os fatores autossômicos M e F e genes de resistência a inseticidas. Esta ligação parece favorecer os determinantes autossômicos (FRANCO *et al.*, 1982; BULL, 1983; HEDIGER *et al.*, 1998). Apesar desta sugestão, há poucos estudos genéticos que descrevem a relação entre resistência a inseticidas e fatores autossômicos (KERR, 1970; SHONO & SCOTT, 1990) e a sugestão é ainda especulativa.

BULL & CHARNOV (1977) levantaram a seguinte questão que surgiu a partir de estudos como estes de *Musca domestica*: como a seleção natural atuaria sobre as mudanças no sistema de determinação do sexo? Estes autores acreditaram que o mecanismo XY em *M. domestica* seja ancestral, uma vez que tanto o cromossomo X como o Y exibem heteropicnose (HIROYOSHI, 1964), o Y é inteiramente heterocromático e os dois mostram tamanho desigual. Todas estas são características de um mecanismo “velho” de cromossomos sexuais bem estabelecido. Nos outros dois mecanismos de determinação do sexo em *Musca* (fatores M e F), os loci que determinam o sexo estão em autossomos que não mostram estas características. Concluem, então, que a evolução de machos XX tenha resultado

quando o mecanismo XX/XY foi invadido por um forte determinador do macho sobre o autossomo III. Pela mesma razão, machos XX teriam maior adaptação que machos XY, e o cromossomo Y teria sido contra selecionado.

A mosca Phoridae *Megaselia scalaris* tem também um sistema peculiar de determinação do sexo, no qual algum dos três elementos cromossômicos do cariótipo haplóide pode funcionar como um cromossomo determinante de machos (MAINX, 1959; 1962; 1964; BURISCH, 1963).

A espécie *Megaselia scalaris*, como já dito, possui três pares de cromossomos, incluindo um par homomórfico de cromossomos sexuais. Por seleção conseguiu-se estabelecer cinco linhagens de machos, onde o cromossomo Y original foi perdido e a determinação do sexo primária foi associada a um novo cromossomo, na maioria dos casos, provavelmente por transposição das funções do determinador de machos (TRAUT & WILLHOEFT, 1990). Estes autores localizaram o fator de determinação de machos nas cinco linhagens onde o Y original havia sido perdido. Em uma destas linhagens o locus original de determinação do sexo, M, foi preservado dentro de um grande segmento do Y original; o novo cromossomo Y só existe devido a uma recombinação entre os cromossomos X e Y originais. Nas outras quatro linhagens, a determinação do sexo foi conduzida por um novo *locus* diferente, desse modo, criando um cromossomo Y completamente novo (TRAUT, 1994).

Como os marcadores de MAINX (1966) foram perdidos, não foi possível comparar seus mapas com os conhecidos recentemente, mas é certo que as posições dos novos loci de determinação do sexo em *Megaselia scalaris* não são sempre terminais e nem sempre estão nos finais dos mesmos cromossomos, como acreditava MAINX. Embora as seqüências não tenham sido identificadas, a transposição de fatores M para vários sítios cromossômicos é mesmo o mecanismo mais plausível (WILLHOEFT & TRAUT, 1990; SIEVERT *et al.*, 1997).

Nos Chironomídeos, um fator dominante de determinação do sexo (M) é o responsável pela diferenciação do sexo nos machos (BEERMANN, 1955; MARTIN & LEE, 1980; HÄGELE, 1985).

No gênero *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) machos são heterogaméticos e fêmeas são homogaméticas, contudo há somente algumas espécies deste gênero, onde se consegue distinguir morfologicamente os cromossomos sexuais.

A região determinadora do sexo neste grupo pode ocorrer nos braços de diferentes cromossomos podendo tal variação ser observada tanto em espécies diferentes como entre indivíduos da mesma espécie (BEERMAN, 1955; MARTIN *et al.*, 1980).

Estes últimos autores sugeriram, com base na frequência com que cada região que determina o sexo muda na espécie *Chironomus australiano*, que estas mudanças não foram apenas coincidência; foram adaptativas para o processo de especiação.

Nas espécies *C. nuditarsi* e *C. thummi thummi* há um polimorfismo de heterocromatina descrito como associado à região de determinação do sexo. Em outras espécies, como por exemplo *C. thummi piger*, não há marcador para reconhecimento dos cromossomos sexuais. Assim, na evolução em *C. thummi piger* os cromossomos sexuais podem estar num estágio inicial (KRAEMER & SCHMIDT, 1993).

Há dúvidas se um número limitado de regiões nos cromossomos determinam o sexo, ou seja, se os genes estão envolvidos com a determinação do sexo (MARTIN *et al.*, 1980; MARTIN, 1981; KRAEMER & SCHMIDT, 1993) ou se o determinador do sexo nestas espécies é um elemento de transposição (GREEN, 1980) que poderá ser inserido em algum lugar do genoma (MARTIN & LEE, 1984). Embora seja razoável atribuir a “genes saltadores” a responsabilidade de tal fenômeno, não se pode excluir outras explicações. Devido ao fato de em *Chironomus* o mecanismo de determinação do sexo ser considerado primitivo, pode-se supor que genes diferentes façam parte de um mecanismo de determinação do sexo em cascata. Em uma espécie pode ser que um determinado gene seja decisivo e, em outras, um outro gene seja importante. Não se pode assumir que só existe um determinador do sexo em todas as espécies do grupo.

O fato das mudanças cromossômicas não serem apenas coincidência, mas adaptativas e integrais para o processo de especiação foi também sugerido por FERADAY *et al.* (1989). Estes autores mostram que há um consenso não somente no sentido que a diferenciação do X e Y é um processo adaptativo por ele próprio mas que estes cromossomos geralmente desempenham um papel adaptativo no processo de especiação.

Em Simuliidae há completa homologia entre os cromossomos X e Y. A diferença fundamental entre os cromossomos sexuais é a presença de um único fator

de determinação de machos, presente no cromossomo Y (ROTHFELS, 1956; ROTHFELS & NAMBIAR, 1981). Muitas espécies de Simuliídeos mostram os cromossomos sexuais citologicamente indiferenciados com padrões idênticos de bandamento nos cromossomos politênicos. A maioria apresenta quiasma na meiose ocorrendo então permutas de genes entre o X e o Y. Além disso, qualquer um dos três cromossomos em Simuliidae pode atuar como o par determinador do sexo e o locus para determinação já foi mapeado em diferentes posições dos seis braços cromossômicos (BEDO, 1977).

1.2. Bandamento Cromossômico

A análise detalhada de regiões cromossômicas específicas, tais como distribuição de heterocromatina (banda C) e organizadores nucleolares (NORs) de cromossomos, pode auxiliar nos estudos de evolução cariotípica (SHARMA & SHARMA, 1983). Estas regiões podem ser detectadas através dos métodos de bandamento.

A era que permitiu identificar morfologicamente os cromossomos metafásicos de uma maneira mais precisa através de bandas longitudinais (bandamento cromossômico) teve início em 1968 quando CASPERSSON e colaboradores descreveram o uso de quinacrina mostarda como um componente fluorescente que corava heterogeneamente cromossomos humanos fixados, produzindo, assim, a chamada banda Q. Logo após isto, PARDUE & GALL (1970) descreveram a técnica de hibridação *in situ* de ácidos nucleicos para localizar DNA satélites em cromossomos de ratos, que vinte anos mais tarde tornou-se indispensável ferramenta nos estudos de vários problemas básicos de genética. Foi também por volta dos anos setenta que SUMNER e colaboradores (1971) e SUMNER (1972) revelaram técnicas de fácil aplicação para obtenção de bandamento C e G através de pré-tratamentos químicos nos cromossomos metafásicos. A base da diferenciação longitudinal dos cromossomos foi assim estabelecida.

O bandamento cromossômico é considerado valioso para identificação de cromossomos homólogos entre espécies cariológicamente diferenciadas, e especialmente para detecção de rearranjos cromossômicos que contribuem para a evolução cariotípica (IMAI *et al.*, 1994). Muitas tentativas de reconstrução de

filogenias de cariótipos de vários taxa têm sido baseadas em análises de padrões de bandamento (QUMSIYEH & BAKER, 1988; SUMNER, 1990).

1.2.1. Bandas Heterocromáticas

Bandas heterocromáticas são essencialmente universais, sendo encontradas nos cromossomos de todos os animais e vegetais (SUMNER, 1994).

Embora heterocromatina tenha sido descrita há muito tempo (HEITZ, 1928), ainda hoje procuram-se métodos de coloração específica para evidenciar diferentes aspectos da heterocromatina. As principais características da heterocromatina, demonstradas por técnicas de bandamento específicas, são sua universalidade, sua diversidade e sua variabilidade. Embora todos os cromossomos, na maioria dos eucariotos, tenham alguma heterocromatina, sua propriedade de coloração e a natureza do DNA que contêm, variam muito dentro e entre espécies, e em geral blocos de heterocromatina são heteromórficos para tamanho, e algumas vezes para propriedades de coloração (SUMNER, 1990).

Bandas heterocromáticas são normalmente encontradas ao redor do centrômero, freqüentemente nos telômeros e adjacentes aos organizadores nucleolares, e algumas vezes em regiões intersticiais. Geralmente compreendem uma proporção relativamente pequena do genoma, mas em casos excepcionais a heterocromatina compreende 50% do DNA da célula (SUMNER, 1994).

Diferenças na quantidade, posição e tipo de heterocromatina são comuns entre espécies. Um exemplo simples de variação é a diferença no tamanho de blocos homólogos de heterocromatina, ou seja, duas espécies próximas têm blocos de heterocromatina aparentemente diferentes, com localização semelhante nos cromossomos homólogos.

Estas diferenças quantitativas são freqüentemente restritas a sítios específicos, ou associadas a eventos específicos. É muito comum espécies próximas diferirem na presença ou ausência de braços heterocromáticos; então, em uma espécie os cromossomos parecem acrocêntricos, mas os cromossomos homólogos em outra espécie são metacêntricos, o segundo braço sendo totalmente heterocromático (PATHAK *et al.*, 1973; CHRISTIDIS, 1986).

Espécies próximas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina no seu genoma, mas também no número de bandas, sua localização e sua propriedade de coloração. As duas primeiras categorias são normalmente relacionadas, uma vez que uma distribuição diferencial de bandas freqüentemente implica num número diferente e vice-versa. Poucos exemplos de diferenças numéricas nas bandas heterocromáticas podem ser dados. Muitas das bandas C positivas únicas em *Triturus italicus* aparecem como pares de bandas em *Triturus vulgaris* (NARDI *et al.*, 1973). Em *Anemone* spp o número de bandas C positivas na parte distal de certos cromossomos varia de zero a quatro em diferentes espécies (MARKS & SCHWEIZER, 1974). Diferenças tanto no número como na localização de bandas foram encontradas em espécies da mosca tsé-tsé, *Glossina*. *G. morsitans* tem grupos de bandas terminais no braço longo de seus autossomos e no cromossomo X, enquanto estão ausentes em *G. austeni*, embora os autossomos tenham padrão semelhante (DAVIES & SOUTHERN, 1976). Diferenças na localização da heterocromatina entre espécies próximas são muito comuns e algumas vezes complexas. Freqüentemente uma espécie poderá ter bandas C terminais nos seus cromossomos que são perdidas em uma espécie próxima; isto tem sido encontrado em algumas plantas e anfíbios (KING, 1980), embora as diferenças mais complexas sejam encontradas em gafanhotos (KING & JOHN, 1980).

Três mecanismos parecem claros para explicar o aparecimento de uma banda heterocromática em um novo sítio. Primeiro, há movimentação, por translocação ou inversão, total ou parcial de uma banda. Segundo, novas bandas poderão ser formadas pelo processo de transformação de eucromatina. Terceiro, uma nova banda poderá ser formada pela amplificação de uma sequência de DNA. Obviamente uma combinação de eventos (translocação seguida por amplificação) poderá estar envolvida em alguns casos, mas há pouca ou nenhuma evidência para distinguir os vários mecanismos possíveis (SUMNER, 1990).

Sabe-se que em várias espécies de moscas, incluindo *Musca domestica* (EL AGOSE *et al.*, 1992), *Chrysomya bezziana* (BEDO, 1991), espécies do gênero *Parasarcophaga* (KAUL *et al.*, 1978), várias espécies de *Drosophila*, bem como espécies de mosquitos, como *Aedes aegypti* (WALLACE & NEWTON, 1987), *Anopheles atroparvus* e *Anopheles labranchiae* (MARCHI & MEZZANOTTE, 1990), os cromossomos sexuais apresentam regiões ou braços ou, então, são

totalmente heterocromáticos. Tal situação não é encontrada no caso de ausência de par heteromórfico que possa indicar a presença de par sexual. Neste caso o(s) gene(s) para determinação do sexo estaria(m) espalhado(s) pelo(s) pare(s) (autossômico(s) (Revisão PARISE, 1994).

Enzimas de restrição têm sido bastante usadas para detectar diferenciação entre diferentes classes de heterocromatina. Estas enzimas estão sendo usadas para produzir modelos de bandamento consistentes em cromossomos de mamíferos e insetos (LIMA de FARIA *et al.*, 1980; MILLER *et al.*, 1984; MEZZANOTTE, 1986; GOSALVEZ *et al.*, 1987).

Extração de fragmentos de DNA, clivados da cromatina fixada, foi proposta como o mecanismo predominante para produzir bandamento cromossômico após tratamento com enzimas de restrição (MILLER *et al.*, 1984; BIANCHI *et al.*, 1985). Contudo, bandamento com ER não está sempre associado com extração de DNA. Com base nisto, mudanças conformacionais na estrutura cromossômica causadas pelo corte (nicking) da molécula de DNA, especialmente perda de DNA, foram sugeridas para explicar os resultados produzidos pelas ERs em cromossomos humanos (MEZZANOTTE *et al.*, 1985). O difícil acesso das enzimas ao DNA cromossomal tem também sido considerado como possível causa para a observação destes resultados. A importância relativa e inter-relação destes fatores na indução da diferenciação longitudinal em cromossomos fixados não estão ainda bem entendidas. No entanto, o uso combinado de diferentes endonucleases de restrição demonstra ser conveniente na detecção de diferentes classes de heterocromatina não reveladas pelas técnicas de bandamento padrão (MARCHI & MEZZANOTTE, 1988).

1.2.2. Hibridação *in situ* X NOR

Hibridação *in situ* de seqüências de nucleotídeos é um procedimento bem estabelecido para cromossomos politênicos, mitóticos e núcleos interfásicos de insetos. O método foi inicialmente desenvolvido por PARDUE & GALL (1970), que utilizaram sondas marcadas radioativamente em cromossomos politênicos de *Drosophila*. Após alguns anos o método original foi adaptado para métodos mais sensíveis utilizando sondas com marcação não radioativas (PHILLIPS *et al.*, 1994).

Hoje em dia a hibridação *in situ* em cromossomos vem sendo usada em estudos evolutivos de espécies de dípteros fornecendo importantes informações,

incluindo conservação de genes em grupos de espécies próximas (WHITING *et al.*, 1987; 1989; SCHMIDT *et al.*, 1988).

Na maioria das células de eucariotos, o nucléolo desaparece durante a prófase e a sua localização cromossômica (NOR) é visualizada pela técnica de impregnação pela prata (AgNOR). Porém em alguns organismos como espécies de Dípteros (PARISE *et al.*, 1996; HÄGELE & RANGANATH, 1983) e em formigas (IMAI *et al.*, 1994) as NORs não são detectadas por este método em metáfases mitóticas.

IMAI e colaboradores (1992) sugerem as seguintes hipóteses para explicar tal fenômeno: que os genes de rRNA são completamente inativados durante a divisão celular e as partículas de prata não conseguem se ligar às proteínas AgNOR (SUMNER, 1992) ou que o nucleólo de formigas teria o centro fibrilar ausente como é observado em *Drosophila* (KNIBIEHLER *et al.*, 1982).

Uma outra explicação estaria relacionada com as proteínas associadas à NOR. Sabe-se que em vertebrados existem proteínas associadas a NOR semelhantes às de invertebrados. A principal diferença entre elas, que impede que haja especificidade à impregnação por prata, poderiam ser os domínios ácidos da porção amino-terminal destas proteínas que de certa forma alteraria o PI. Por exemplo: considerando que os blocos de aminoácidos ácidos da nucleolina sejam responsáveis pela reação em células de mamíferos, pode-se supor que em invertebrados a mesma proteína possua diferentes blocos ácidos ou que as condições do método não sejam específicas para proteínas AgNOR de insetos (HERNANDEZ-VERDUM, comunicação pessoal). Assim, a utilização da técnica de hibridação *in situ*, se tornou de grande importância e precisão para os estudos de NORs em dípteros.

Na maioria das espécies de dípteros estudadas até o momento, as NORs estão relacionadas aos cromossomos sexuais. Por exemplo, WILLHOEFT (1997) detectou através de hibridação *in situ* usando rDNA que em algumas espécies de *Glossina* (Diptera, Glossinidae), como *G. p. palpalis* e *G. pallidipes* a marcação ribossomal está localizada no cromossomo Y, que nas duas espécies é totalmente heterocromático.

Nas espécies *Ceratitis capitata*, *C. rosa* e *Trihithrum coffeae* (Diptera, Tephritidae) o X subacrocentrico carrega o loci ribossomal no braço curto. Nas três

espécies o Y também apresenta loci DNA ribossomal. Esta parte do cromossomo Y é considerada homóloga nas três espécies (WILLHOEFT & FRANZ, 1996).

KUMAR & RAI (1990) estudaram a localização do rDNA em oito gêneros de Culicidae e encontraram que o gene rRNA está confinado num único cromossomo em todas as espécies estudadas, com exceção de *Aedes triseriatus*, onde foram observados dois sítios por cariótipo haplóide. Na única espécie de Anophelinae analisada, os genes ribossomais estão localizados nos cromossomos sexuais e em todas as espécies de *Aedes*, assim como em outras espécies os genes ribossomais estão localizados no cromossomo I, que nas espécies de *Culex* e *Aedes* está envolvido com a determinação do sexo (MACDONALD & RAI, 1970; BAKER *et al.*, 1971; DENNHÖEFER, 1972). O sexo é determinado por um único par de alelos ou um segmento de cromossomos para o qual os machos são heterozigotos e as fêmeas homozigotas. Isto indica que os genes ribossomais são conservados nos cromossomos sexuais na maioria das espécies de mosquitos (KUMAR & RAI, 1990).

Em outras espécies de insetos, NORs também estão localizadas nos cromossomos sexuais, como é o caso do X e Y de *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* e *D. hydei* (SPEAR, 1974; HENNIG *et al.*, 1975), somente no cromossomo X de *D. virilis* (ENDOW & GALL, 1975), no Y e em microcromossomos de *D. nasuta nasuta* e *D. n. albomicans* (HÄGELE & RANGANATTI, 1983), no X e microcromossomos no complexo *mulleri* (BICUDO, 1981) e no X e em autossomos de gafanhotos (WHITE *et al.*, 1982).

1.3. Dípteros Muscóideos

Os muscóideos constituem importante grupo de dípteros incluindo desde espécies sem importância direta para o homem até espécies que competem com ele por alimentos ou atuam como vetores de doenças.

Segundo GRIFTHS (1972) os chamados dípteros muscoideos incluem: Tanypezoinea, Calyptratae, Micropezoinea, Diopsioinea, Sciomyzoinea, Anthomyzoinea, Agromyzoinea e Tephritoinea. As famílias Muscidae, Sarcophagidae e Calliphoridae fazem parte dos Calyptratae.

Um estudo citogenético incluindo 129 espécies de dípteros muscóideos revelou que destas, seis possuem cinco pares de cromossomos (todas pertencentes à

família Muscidae) e 121 espécies apresentam seis pares. Foi encontrado também que uma espécie de Anthomyiidae tem sete pares nas fêmeas e cinco + X1, X2 e Y nos machos e uma espécie de Sarcófagídeo apresenta 9-10 pares de cromossomos (BOYES & VAN BRINK, 1965). Estes dados mostram uma considerável uniformidade no número de cromossomos do grupo.

2. Objetivos

2.1. Justificativa

Dentro das espécies de Dípteros Cyclorrapha o número de pares de cromossomos mais encontrado é $2n=12$. No entanto, algumas espécies apresentando $2n=10$ já foram descritas, sendo todas elas pertencentes à família Muscidae. De acordo com BOYES (1967) e com nossos próprios estudos (PARISE *et al.*, 1996), o par ausente nestas espécies é o par heteromórfico, interpretado como sendo o par sexual.

Muitas variações são notadas com respeito ao tamanho dos cromossomos sexuais em todas as subfamílias de Muscidae e isto sugere que mudanças nos cromossomos sexuais podem ser toleradas pelas espécies na maioria destas subfamílias sem que ocorram consequências sérias (BOYES *et al.*, 1964). A explicação para a presença de representantes com $2n=10$, em diferentes subfamílias, seria a ocorrência de perdas independentes dos cromossomos sexuais nos diferentes grupos, e não uma origem comum a todos eles.

Assim, o objetivo inicial do trabalho foi examinar algumas espécies de Muscidae pertencentes a diferentes subfamílias, além de espécies de outras famílias a ela relacionadas, como Calliphoridae e Sarcophagidae, quanto à presença ou não do par heteromórfico, na tentativa de corroborar a hipótese de perdas independentes nos diferentes grupos. Além disso, uma vez que parece haver uma relação de NORs e /ou bandas C positivas com cromossomos sexuais, foi feito um estudo mais detalhado do cariótipo destas espécies através de bandamento cromossômico, e métodos mais específicos, como hibridação *in situ*.

Desta forma, como há relação entre NORs e/ou heterocromatina com o par sexual nas espécies com $2n=12$, conhecendo-se melhor a localização e natureza destas regiões nas espécies com $2n=10$, estes dados poderão ajudar no entendimento da evolução do par sexual dentro do grupo.

2.2. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Investigar a presença ou ausência dos cromossomos sexuais em cinco espécies da família Muscidae, duas espécies de Calliphoridae e uma de Sarcophagidae.
2. Caracterizar os cromossomos sexuais destas espécies com relação à forma, tamanho e quantidade de heterocromatina constitutiva.
3. Localizar as regiões organizadoras do nucléolo através da técnica de hibridação *in situ*.
4. Determinar o cariótipo das espécies *Ophyra chalcogaster*, *Synthesiomyia nudiseta* e *Pattonella intermutans* e de uma população de *Musca domestica*.
5. Localizar as regiões de heterocromatina constitutiva nos autossomos das espécies analisadas através de bandamento C.

3. TRABALHOS

Sex chromosome variation among Muscidae flies

Patricia P. Parise-Maltempi & Rita M. P. Avancini

P.P. Parise-Maltempi and R.M.P. Avancini*, Department of Cell Biology and *Department of Parasitology, Institute of Biology, P.O. Box 6109, State University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Patricia P. Parise-Maltempi, Department of Cell Biology, Institute of Biology, P.O. Box 6109, State University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil.
Phone: +55 19 7887786. Fax: +55 19 7887821.
E-mail: parise@obelix.unicamp.br

Abstract

The karyotypes of three species of Muscidae are described. *Synthesiomyia nudiseta* (subfamily Reinwardtiinae), *Ophyra chalcogaster* (subfamily Azeliinae) and *Musca domestica* (subfamily Muscinae) have $2n=12$ chromosomes, consistent with the modal number of chromosome pairs in most calyptrate Diptera. Comparison of these three species with two other species of Muscidae (*Muscina stabulans* and *Haematobia irritans*) revealed a considerable variation among their sex chromosomes. Thus, in *M. stabulans* and *H. irritans* ($2n=10$) these chromosomes are absent, in *S. nudiseta* the X chromosome is the biggest of the complement, in *O. chalcogaster* it is the smallest and in *M. domestica* this chromosome has an intermediate length. The heterochromatic regions of these species are pericentromeric in all autosomes and distributed along the entire length of the sex chromosomes. FISH identified NORs on the autosomes.

Introduction

Several species of Muscidae are of economic and/or sanitary importance. The horn fly, *Haematobia irritans*, is a common, hematophagous, obligate ectoparasite of cattle in Europe, North America and, more recently, in South America (WILLIAMS *et al.*, 1985; BORJA, 1990). The estimated annual losses in US cattle production attributed to this pest exceed US\$ 730 million (DRUMOND *et al.*, 1981). The house fly, *Musca domestica*, is widespread, breeds in a variety of organic matter, including human and animal excrement, and is a significant nuisance to human populations (HARDWOOD & JAMES, 1979). *Muscina stabulans* is also widespread throughout the world and is usually associated with waste products of livestock and agricultural processes (WILLIAMS *et al.*, 1985). *Musca domestica* and *M. stabulans* may be involved in the transmission of various pathogenic organisms to humans and animals. *Ophyra chalcogaster* is a neotropical species found near poultry facilities and its larvae are facultative predators on the larvae of other flies, including the house fly. *Synthesyomyia nudiseta* is a cosmopolitan species which breeds in various animal and vegetable materials and shows a high degree of synanthropy in Brazil (LINHARES, 1981).

The usual karyotype number in Cyclorhapha diptera species is $2n=12$, although some species, all belonging to the Muscidae, have $2n=10$. Among the latter species, *Muscina stabulans* and *Haematobia irritans* were studied by AVANCINI and WEINZIERL (1994), PARISE (1994) and PARISE *et al.* (1996). These studies, together with those of BOYES *et al.* (1964) and BOYES (1967), indicate that it is the heteromorphic pair, usually considered to be the sex chromosomes that is absent. The occurrence of $2n=10$ species in different subfamilies of Muscidae probably reflects independent losses of sex chromosomes in different groups rather than a common origin for these species (BOYES, 1967).

In this work, we studied the karyotype of five species of Muscidae using chromosome banding and methods such as *in situ* hybridization. We also determined the location of NOR(s) and heterochromatin in species with $2n=10$ and $2n=12$. In dipterans, the NORs are frequently located on the sex chromosomes (BEDO and HOWELLS, 1987; BEDO and WEBB, 1989; WILLHOEFT and FRANZ, 1996; WILLHOEFT, 1997).

Material and methods

Fly rearing- The colonies of the species used in this work were started with individuals collected in the following places: *Ophyra chalcogaster* and *Synthesiomia nudiseta*: Campus of State University of Campinas, Brazil; *Musca domestica*: Sumaré-SP, Brazil; *Muscina stabulans*: a private poultry farm located 40km southwest of the State University of Campinas. The flies were maintained in the Entomology section of the Department of Parasitology, State University of Campinas. The adults had access to sugar cane and water 24 h/day, and were maintained at $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, 40-50% relative humidity on a 12h light:dark cycle. To obtain eggs, the flies were fed with ground beef.

Chromosome preparations- Mitotic chromosomes were obtained from the brains of L3 larvae. Meiotic chromosomes were obtained from the testicular cells of young males. Hypotonic treatment and fixation were as described by IMAI *et al.* (1988).

Chromosome morphology- Mean descriptive values of the karyotype were calculated from information obtained from a minimum of one well spread mitotic metaphase plate from each of 5-10 individuals. The nomenclature used for describing of chromosome morphology was that of LEVAN *et al.* (1964).

C-banding- It was performed using SUMNER's technique (1972), with slight modifications of temperatures to allow the localization of constitutive heterochromatic regions.

FISH- *In situ* hybridization was performed in mitotic and/or meiotic cells using a 12kb rDNA probe (pDm 238-*Drosophila melanogaster*). The FISH procedure was done as described in PARISE and AVANCINI (paper submitted).

After *in situ* hybridization, some slides were washed in water for 2 h and stained with Giemsa for better morphological identification of each chromosome and confirmation of the exact location of the signal (VIEGAS-PEQUIGNOT, 1992).

The slides were examined using an Olympus fluorescence microscope. and photographs were taken on 400 ASA color negative film.

RESULTS

Ophyra chalcogaster (subfamily Azeliinae)

This species has six pairs of chromosomes with two pairs of metacentric chromosomes (II and V) and three pairs of submetacentric chromosomes (I, III and IV). Pair IV has an arm ratio very close to the limit between metacentric and submetacentric chromosomes, and was classified as submetacentric. Pair I has a secondary constriction in the short arm (Fig. 2). Figure 1 shows the karyotype of this species and the results of the morphometric analysis are given in Tables I and II. All the autosomes exhibited somatic pairing. The sex chromosomes form a very small metacentric pair in which X is approximately 3.5 times smaller than chromosome I, the longest chromosome of the whole complement.

Figures 5 and 6 show the C-band pattern for this species. All the autosomes have small blocks of heterochromatin in the pericentromeric region (Fig. 5) and the sex chromosomes are totally heterochromatic (Fig. 6). There is an interstitial band on the short arm of pair II and another on the long arm of pair III (Fig. 6, arrow).

Synthesiomyia nudiseta (subfamily Reinwardtiinae)

This species also has six pairs of chromosomes with five autosomes and a sex chromosome pair (XX/XY) (Figs. 3 and 4).

The karyotype is illustrated in Figure 3 and the data for the complement are shown in Tables I and II. Pairs I, II, IV and V are metacentric and pair III is submetacentric. All the autosomes exhibited somatic pairing.

The sex chromosomes appear very heteropycnotic by conventional stainings (Figs. 3 and 4). X is the longest chromosome of the complement and together with Y, form a typical metacentric pair.

C banding of mitotic chromosomes, shows constitutive heterochromatin in the pericentromeric region of all the autosomes (Figs. 7, 8). The sex chromosomes are totally heterochromatic (Figs. 7, 8).

***Musca domestica* (subfamily Muscinae)**

The population of this species studied here has six pairs of chromosomes (Fig. 9). Morphometric analysis revealed two pairs of submetacentric (III and IV) and three pairs of metacentric autosomes (I, II and V). All the autosomes exhibited somatic pairing. The X chromosome is also metacentric (Table I and II). No Y chromosome was found in 36 individuals examined.

All the autosomes have pericentromeric C bands (Fig. 9). The X chromosome is totally heterochromatic, although darker staining is seen in the pericentromeric region (Fig. 9, arrow).

***In situ* hybridization**

In situ hybridization with an rDNA probe showed that the NOR is located on autosomal pairs in the Muscidae species studied here.

There is an intense signal in pair II of *M. stabulans* (Fig. 12), which coincided with the location of the secondary constriction and a big block of heterochromatin (Fig. 10). In *M. domestica*, the signal is located in pair II (Fig. 13) and in *S. nudiseta* the signal is on pair III (Fig. 14).

Table 1: Total and relative lengths of the chromosomes of several Muscidae species. The relative length of Y was expressed as a function of the length of X. N=10

Species	I	II	III	IV	V	X	Y	TCL (µm)
<i>O. chalcogaster</i>	8.3	7.3	6.6	6.4	5.7	2.7	1.7	37
<i>M. domestica</i>	7.1	6.4	5.8	5.0	4.6	6.6	n.a.	35.5
<i>S. nudiseta</i>	7.2	4.9	4.4	4.0	3.5	8.7	6.6	32.7
<i>M. stabulans</i> *	7.4	6.4	5.6	5.2	4.9	-	-	29.5
<i>H. irritans</i> *	6.7	6.0	5.5	5.1	4.3	-	-	27.6

*The karyotype of these species was studied by PARISE (1994) and PARISE *et al.* (1996), AVANCINI & WEINZIERL (1994).

TCL: total complement length; n.a.: not available

Table 2: Chromosome arm ratios of several Muscidae species.

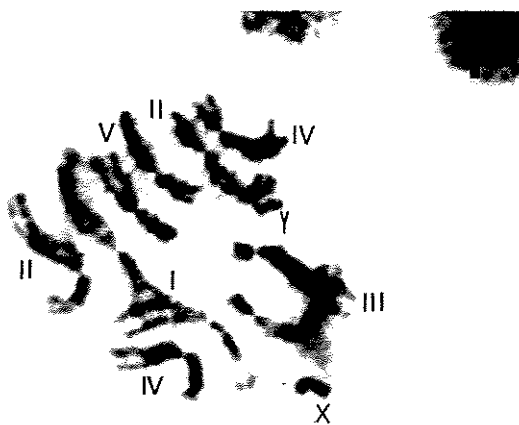
Species	I	II	III	IV	V	X	Y
<i>O. chalcogaster</i>	1.9(Sb)	1.4(M)	2.8(Sb)	1.7(Sb)	1.4(M)	1.5(M)	1.3(M)
<i>M. domestica</i>	1.3(M)	1.4(M)	1.7(Sb)	1.7(Sb)	1.4(M)	1.6(M)	n.a.
<i>S. nudiseta</i>	1.1(M)	1.2(M)	2.0(Sb)	1.4(M)	1.3(M)	1.4(M)	1.2(M)
<i>M. stabulans</i> *	1.1(M)	1.1(M)	1.5(M)	1.7(Sb)	1.3(M)	-	-
<i>H. irritans</i> *	1.3(M)	1.1(M)	2.3(Sb)	2.0(Sb)	1.6(M)	-	-

*The karyotype of these species was studied by PARISE (1994) and PARISE *et al.* (1996), AVANCINI & WEINZIERL (1994).

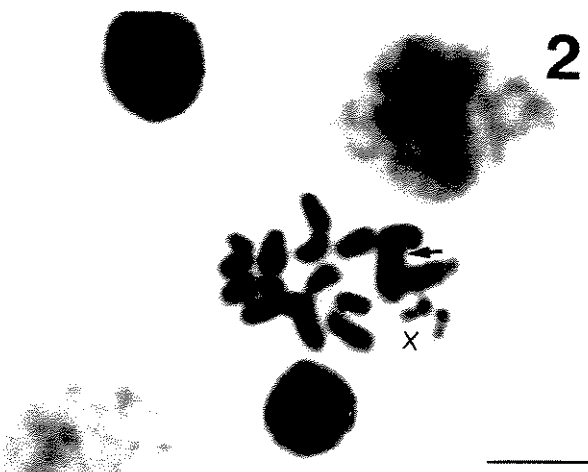
M: metacentric; Sb: submetacentric; n.a.: not available

Figs. 1, 2: Mitotic chromosomes in *O. chalcogaster*. 1: Male metaphase; 2: Female metaphase. Arrow in Fig. 2 shows the secondary constriction in pair I.

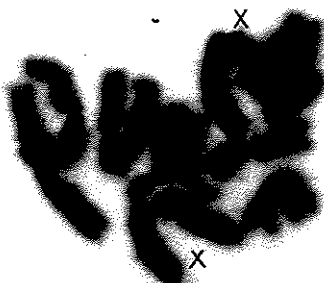
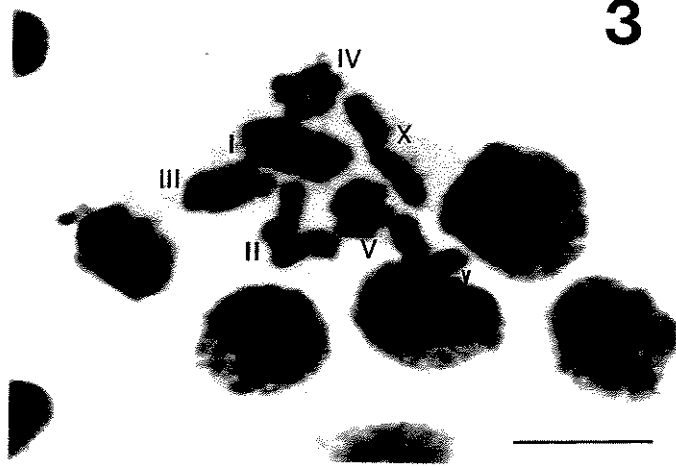
Figs. 3, 4: Mitotic chromosomes in *S. nudiseta*. Note the somatic pairing. 3: Mitotic male metaphase; 4: mitotic female metaphase. Scale bar= 10 μ m



3



4

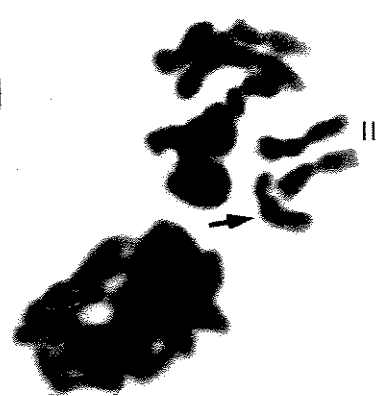


Figs 5-8: C-banded chromosomes. Figs. 5, 6: Mitotic chromosomes of *O. chalcogaster* and Figs. 7, 8: Mitotic chromosomes of *S. nudiseta*. Sex chromosomes are totally heterochromatic and the autosomes present pericentromeric bands. Arrow in Fig. 6 indicates an interstitial band in pair II. In Fig. 8 all the chromosomes exhibit somatic pairing. Scale Bar= 10µm.

Fig. 9: Mitotic chromosomes in *M. domestica*; somatic pairing seen in all chromosomes Scale Bar= 10µm.

Figs 10, 11: C band in *M. stabulans* and *H. irritans* mitotic complement: five chromosome pairs in each species. Arrows indicate an interstitial C band in pair II. Scale Bar= 10µm

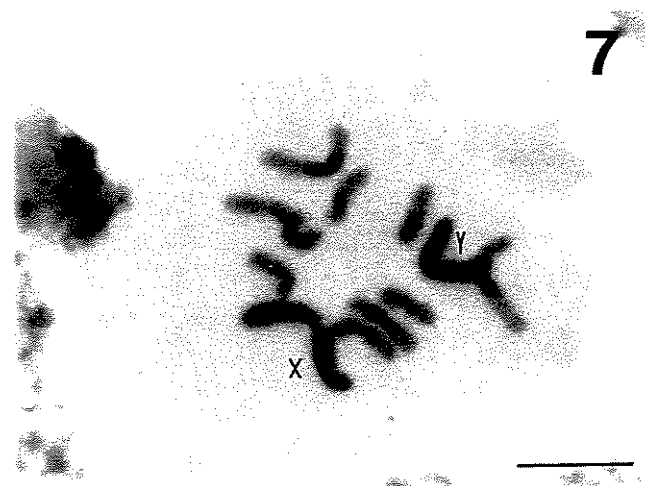
6



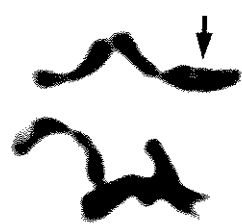
5



7



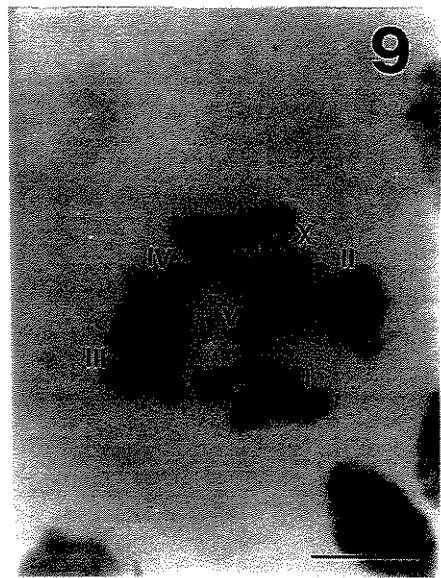
11



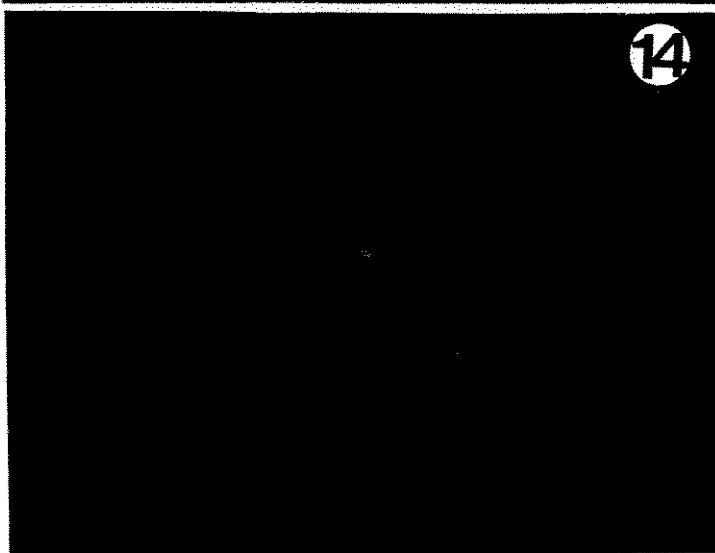
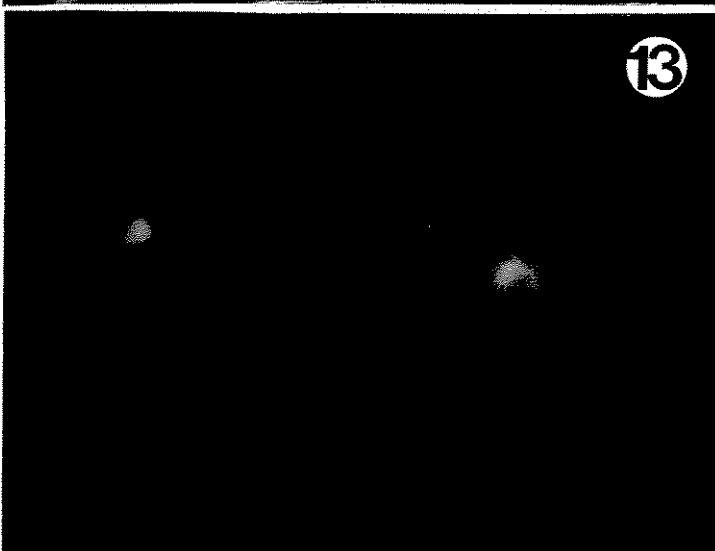
10



9



Figs. 12-14: FISH of *M. stabulans* (mitotic chromosomes), *M. domestica* (meiotic chromosomes) and *S. nudiseta* (meiotic chromosomes), using a *Drosophila* rDNA probe. The hybridization signal is yellow, whereas the chromosomes and nuclei are counterstained with propidium iodide. Figs 12, 13: NOR located in pair II and Fig. 14: NOR located in pair III.



Discussion

Most Muscidae species have six pairs of chromosomes, one being the heteromorphic pair (BOYES *et al.*, 1964). Our results generally agree with these authors, except *M. stabulans* (subfamily Reinwardtiinae) and *H. irritans* (subfamily Muscinae) which have five chromosome pairs, without the heteromorphic pair.

In addition to *M. stabulans*, BOYES and collaborators (1964) found other exceptions with five chromosome pairs, including *Phaonia variegata* (subfamily Phaoniinae) and *Orthelia nudissima* (subfamily Muscinae).

KAUL and TEWARI (1979) studied seven species of the family Muscidae. Four of these were in the subfamily Phaoniinae and had $2n=10$ while the remaining three had $2n=12$. However, the complement of these species did not resemble those of other $2n=10$ species since they had four pairs of medium to very large metacentric chromosomes and a pair of small dot-like chromosomes. The dot-like chromosomes were suggested to be the sex pair because they did not show somatic pairing.

No heteromorphic pair was found in the species with 10 chromosomes studied here. The karyotypes of these species differed from each other in some aspects. In *H. irritans*, pairs III and IV were submetacentric while in *M. stabulans* only pair IV was submetacentric. In addition, *M. stabulans* had two secondary constrictions in pair I and another in pair II, whereas *H. irritans* had only one secondary constriction located in pair II. All the chromosome pairs of these species showed somatic pairing.

BOYES and collaborators (1964) also noted variations in the arm ratios and location of secondary constrictions in the species with $2n=10$. Such differences were considered sufficient to indicate that the species were not closely related.

The species studied here showed little variations in the size of their autosomes. In *M. domestica*, *M. stabulans* and *H. irritans*, these chromosomes were slightly larger than in *S. nudiseta* whereas *O. chalcogaster* had much bigger autosomes than the other species.

Autosomal morphology also varied little. Except for *O. chalcogaster*, pair I was typically metacentric. Pairs II and V were metacentric in all species. In *M.*

stabulans pair III was metacentric while in the other species was submetacentric. Pair IV was metacentric in *S. nudiseta* but submetacentric in the other species.

Where present, the sex chromosomes were metacentric but varied considerably in size. *O. chalcogaster*, which had the biggest autosomes, had very small sex chromosomes. In *S. nudiseta*, these chromosomes were very big, with the X chromosome being the largest of the complement. In *M. domestica* the sex chromosomes were of medium size.

The total chromosome length was very similar in four (*M. stabulans*, *H. irritans*, *M. domestica* and *S. nudiseta*) of the five species, excluding the X chromosomes in *M. domestica* and *S. nudiseta*. This observation indicates that the absence of sex chromosomes makes the genomes of *M. stabulans* and *H. irritans* shorter than in flies where the X chromosome is present. There was no evidence of a possible fusion of sex chromosomes to autosomes.

Variations have also been reported in the morphology of the sex chromosomes in the subfamily Muscinae (BOYES *et al.*, 1964). Thus, the Y chromosome of *Musca vetustissima* is exceptionally long and submetacentric, that of *M. domestica calleva* is relatively small and metacentric, and that of *M. autumnalis* is tiny and acrocentric. These authors described a similar situation in the subfamily Phaoniinae, where *Phaonia basalis* had a very large sex pair, *Ophyra leucostoma* had tiny sex chromosomes and *Muscina stabulans* and *Phaonia variegata* lacked the sex pair normally present in the 12 chromosome species.

Variations similar to the above were also observed in the present study, suggesting that substantial changes in these chromosomes can be tolerated, without serious consequences, by species in most of these subfamilies. That most of these species have sexual chromosomes, however small they may be, indicates that the presence of sex chromosomes represents the more primitive condition of the Muscidae. The reduction in chromosome number appears to have occurred independently in the different genera of the two subfamilies (BOYES *et al.*, 1964).

If one accepts the hypothesis of the loss of sex chromosomes in Muscidae, the evolution of these chromosomes from homomorphic sex chromosomes must be considered (OHNO, 1967; for reviews see BULL (1983) and JOHN (1988). Thus, the

absence of sex chromosomes could represent a new stage after the differentiation of these chromosomes.

The quantity and localization of constitutive heterochromatin have a significant role in sex chromosome evolution. The incorporation of heterochromatin represents an initial step in the specialization of these chromosomes (JOHN, 1988; Reviewed by JABLONKA and LAMB, 1990). SCHMID (1983) has argued that heterochromatinization precedes morphological differentiation of the sex chromosomes. This initial step is believed to isolate a chromosomal segment containing one or more major sex determining genes from recombination (OHNO, 1967).

Most Dipteran species have heterochromatin which can extend from pericentromeric regions to include whole arms of some chromosomes or even the entire sex chromosomes (EL AGOSE *et al.*, 1992; BEDO, 1991; KAUL *et al.*, 1978; WALLACE and NEWTON, 1987; MARCHI and MEZZANOTTE, 1990). In the species examined here, the sex chromosomes were totally heterochromatic and there was extensive variation in the amount of heterochromatin among the autosomes of these species.

BOYES and VAN BRINK (1965) reported a tendency for the X chromosome (and to a lesser extent Y) to accumulate heterochromatin and increase in size in several subfamilies of calyptrate Diptera. These authors believed that in some Muscidae subfamilies the large X and Y chromosomes had been completely and independently lost.

The NORs are also good markers for evolutionary studies since the rDNA genes are extremely well conserved amongst diptera species. In most diptera species, the NOR(s) are located in the sex chromosomes (BEDO and HOWELLS, 1987; BEDO and WEBB, 1989; WILLHOEFT and FRANZ, 1996; WILLHOEFT, 1997).

In the present study, the NORs were located in autosomes and not in sex chromosomes. This situation may represent an intermediate step in chromosomal evolution in this group. Some genome sequences, including NOR(s), may be moved from the sex chromosomes to autosomes, to avoid damage should there be partial loss of the sex chromosomes.

In general, certain cytogenetically important regions always occurred on chromosomes II and III. Thus, *M. stabulans* and *H. irritans* for example, had a secondary constriction in the short arm of chromosome II where there was also an interstitial C band. The NOR was located in this same region in *M. stabulans*. *O. chalcogaster* had a C band in pair II and another in pair III. In *S. nudiseta* the NOR was located in pair III and in *M. domestica* in pair II.

Chromosomes II and III may well be associated with sex determination, as has been reported in some Diptera species. Thus, in addition to heterogametic sex determination (KERR, 1961; HIROYOSHI, 1964; MILANI *et al.*, 1967; WAGONER, 1969), *M. domestica* has an additional mechanism in which both sexes are XX and some sex determining factors are located in the autosomes (WAGONER, 1969; RUBINI and FRANCO, 1972; HIROYOSHI and INOUE, 1979; TOMITA and WADA, 1989), specifically in autosomes II and III (FRANCO *et al.*, 1982; BULL 1983; DENHOLM *et al.*, 1985; ÇAKIR and KENCE, 1996).

No Y chromosomes were observed in the individuals of *M. domestica* examined. Although the population studied was small, this situation above mentioned may be true of Brazil in general.

Acknowledgments

The authors thank Dr. S.M. Recco-Pimentel (Department of Cell Biology-UNICAMP) for the use of the fluorescence photomicroscope and some of her laboratory facilities, Dr. A.P. Prado (Department of Parasitology – UNICAMP) for his valuable information on the taxonomy and distribution of Muscidae, Dr. L. M. Botella of the Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain for supplying the pDm, Dr. Stephen Hyslop (Department of Farmacology-UNICAMP) for reviewing the English of the manuscript.

P.P.P.M. was the recipient a PhD studentship from CAPES.

References

- AVANCINI, R. M. P. & WEINZIERL, R. A. (1994). Karyotype of the Horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae). *Cytologia* **59**: 269-272.
- BEDO, D. G. (1991) Cytological characterization of heterochromatin in mitotic and meiotic chromosomes of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* **34**: 631-637.
- BEDO, D. G. and HOWELLS, A. T. (1987) Chromosomal localization of the white gene of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) by *in situ* hybridization. *Genome* **29**: 72-75.
- BEDO, D. G. and WEBB, G. C. (1989) Conservation of nucleolar structure in polytene tissues of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Chromosoma* **98**: 443-449.
- BORJA, G. E. M. (1990). *Haematobia irritans*. Rev. da Casa da Agric. 12 (1).
- BOYES, J. W. (1967) The cytology of muscoid flies. In: Wright J.W. and Pal R., eds. *Genetics of insect vectors of disease*. W.H.O. Elsevier Publ. Co, Amsterdam, pp 371-384.
- BOYES, J. W.; COREY, M. J. and PATERSON, H. E. (1964) Somatic chromosomes of higher Diptera. IX. Karyotypes of some muscid species. *Can. J. Zool.* **42**: 1025-1036.
- BOYES, J. W. and VAN BRINK, J. M. (1965) Chromosomes of Calyptrate Diptera. *Can. J. Genet. Cytol.* **4**: 537-550.
- BULL, J. J. (1983) *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin-Cummings Publishing Company, California.
- ÇAKIR, S. and KENCE, A. (1996) The distribution of males having XY and XX chromosomes in housefly populations (Diptera: Muscidae) of Turkey. *Genetica* **98**: 205-210.
- DENHOLM, I., FRANCO, M. G., RUBINI, P. G. and VECCHI, M. (1985) Geographical variation in housefly (*Musca domestica* L.) sex determinants within the British Isles. *Genet. Res.* **47**: 19-27.

- DRUMOND, R.G.; LAMBERT, H.E.; SMALLEY, J. and TERRILL, C. E. (1981). Estimated losses of livestock to pests. In: D. Pimentel, ed., CRC handbook of pest management, Boca Raton 13: 545- 576.
- EL AGOSE, M.; LEMEUNIER, F. and PERIQUET, G. (1992) Mitotic and salivary gland chromosome analyses in the *Musca domestica* L. (house fly) (Diptera: Muscidae). *Heredity* **69**: 57-64.
- FRANCO, I.; RUBINI, P. G. and VECCHI, M. (1982) Sex determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica* L. of Western Europe. *Genet. Res.* **40**: 279-293.
- HIROYOSHI, T. (1964) Sex-limited inheritance and abnormal sex ratios in strains of the housefly. *Genetics* **50**: 373-385.
- HIROYOSHI, T. and INOUE, H. (1979) On the IM-chromosome of the housefly. *Jpn. J. Genet.* **54**: 434-437.
- IMAI, H.T.; TAYLOR, R. W.; CROSLAND, M. W. J. and CROZIER, R. H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- JABLONKA, E. and LAMB, M. J. (1990) The evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Biol. Rev.* **65**: 249-276.
- JOHN, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: Verma R.S., ed. *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-147
- KAUL, D.; CHATURVEDI, R.; GAUR, P. and TEWARI, R. R. (1978) Cytogenetics of the genus *Parasarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *Chromosoma* **68**: 73-82.
- KAUL, D. and TEWARI, R.R. (1979) The chromosomes of *Passeromyia heterochaeta* Villeneuve (Muscidae: Diptera). *Experientia* **35**: 1155-1156.
- KERR, R. W. (1961) Inheritance of DDT resistance involving the Y-chromosome in the housefly (*Musca domestica* L.). *Austr. J. Biol. Sci.* **14**: 605- 619.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. and SANDBERG, A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **57**: 201-220.

- LINHARES, A. X. (1981). Synantropy of Muscidae, Faniidae and Anthomyiidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revta. Bras. Ent.* **35**: 231-243.
- MARCHI, A. and MEZZANOTTE, R. (1990) Inter and intraspecific heterochromatin variation detected by restriction endonuclease digestion in two sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex. *Heredity* **65**: 135-142.
- MILANI, R., RUBINI, P. G. and FRANCO, M. G. (1967) Sex determination in the housefly. *Genet. Agraria* **21**: 385-411.
- OHNO, S. (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer-Verlag, Berlin.
- PARISE, P. P. (1994) Estudo citogenético de duas espécies de dípteros de interesse médico-veterinário: *Haematobia irritans* e *Muscina stabulans* (Diptera, Muscidae). Master's thesis, UNICAMP, Campinas.
- PARISE, P. P.; AVANCINI, R. M. P. and RECCO-PIMENTEL, S. M. (1996) Karyotypic characterization of *Muscina stabulans* (Fallen) (Diptera: Muscidae) using conventional staining, silver staining and C-banding. *Caryologia* **49**: 13-20.
- RUBINI, P. G. and FRANCO, M. G. (1972) Localization of the male determining factor, M, present in strain of *Musca domestica* L. *Genet. Agraria* **26**: 217-232.
- SCHMID, M. (1983) Evolution of sex chromosomes and heterogametic systems in Amphibia. *Differentiation* **23**: 13-22.
- SUMNER, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**: 304-306.
- TOMITA, T. and WADA, Y. (1989) Multifactorial sex determining in natural populations of the housefly (*Musca domestica* L.) in Japan. *Jpn. J. Genet.* **64**: 373-382.
- VIEGAS-PEQUIGNOT, E. (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willman D, ed. *In situ hybridization: practical approach*. Oxford University Press, IRL Press, pp 137-158.
- WAGONER, D. E. (1969) Presence of male determining factors found on three autosomes in the housefly, *Musca domestica* L. *Nature* **233**: 187-188.

- WALLACE, A. and NEWTON, M. E. (1987) Heterochromatin diversity and cyclic responses to selective silver staining *Aedes aegypti* (L.). *Chromosoma* **95**: 89-93.
- WILLHOEFT, U. (1997) Fluorescence in situ hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse flies (Diptera: Glossinidae: *Glossina*). *Chrom. Res.* **5**: 262-267.
- WILLHOEFT, U. and FRANZ, G. (1996) Identification of the sex-determining regions of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* **144**: 739-745.

C-banding and FISH in chromosomes of the blowflies *Chrysomya megacephala* and *C. putoria* (Diptera, Calliphoridae)

Patricia P. Parise-Maltempi & Rita M. P. Avancini

P.P. Parise-Maltempi and R.M.P. Avancini*, Department of Cell Biology and *Department of Parasitology, Institute of Biology, P.O. Box 6109, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Patricia P. Parise-Maltempi. Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970 Campinas, SP Brasil.

Phone: +55 19 7887786. Fax: +55 19 7887821.

E-mail: parise@obelix.unicamp.br

Abstract

The blowflies *Chrysomya putoria* and *C. megacephala* have $2n=12$ chromosomes, five metacentric pairs of autosomes and a XX/XY sex chromosome pair. There are no substantial differences in the karyotype morphology of these two species, except for the X chromosome which is subtelocentric in *C. megacephala* and metacentric in *C. putoria* and is about 1.4 times longer in *C. putoria*. All autosomes were characterized by the presence of a C band in the pericentromeric region; *C. putoria* also has an interstitial band in pair III. The sex chromosomes of both species were heterochromatic, except for a small region at the end of the long arm of X chromosome. Ribosomal genes were detected in meiotic chromosomes by FISH and in both species the NOR was located on the sex chromosomes.

Introduction

Chrysomya megacephala and *C. putoria* belong to the family Calliphoridae which includes several common synanthropic forms, most of them with saprophagous habits. Some of these blowflies are considered a serious public health problem since certain species can cause myiasis in man and domestic animals (GREENBERG, 1971; 1973).

The geographic distribution of these two species was: *C. putoria* in Africa and *C. megacephala* in Asia and Australia (JAMES, 1970; GUIMARÃES *et al.*, 1978). At the end of the 1970s, *C. putoria* and *C. megacephala* were introduced into Brazil (GUIMARÃES *et al.*, 1980; PRADO & GUIMARÃES, 1983) and are currently very common and abundant species in this and other South American countries (MARILUIS, 1980; LAURENCE, 1981; PRADO & GUIMARÃES, 1983; LAURENCE, 1986).

Although considerable morphological variation has been found in the karyotypes of the species in this family, the chromosome number is very stable at $2n=12$ with five autosomes and a heteromorphic sex pair (STEVENS, 1908; METZ, 1916; 1922; KENEUKE, 1924; BOYES & WILKES, 1953; BOYES & VAN BRINK, 1965; BOYES & SHEWELL, 1975).

AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983) studied the chromosomes of some Brazilian strains of three *Chrysomya* species a few years after their introduction into this country. Based on comparison of their results with those of others (ÜLLERICH, 1976), these authors concluded that one of the species introduced into Brazil was *C. chloropyga* and not *C. putoria*. The external morphology of *C. chloropyga* is very similar to that of *C. putoria* (WIEDMAN, 1830). Based mainly on this similarity, ZUMPT (1956) concluded that these flies were subspecies rather than species, although this author subsequently accepted them as separated species (ZUMPT, 1975). BOYES & SHEWELL (1975) and ÜLLERICH (1976) also considered these flies to be distinct species based on a cytogenetic analysis.

In the present paper, we examined the karyotype of *C. megacephala* and *C. putoria* and confirmed that one of the species introduced into Brazil was in fact *C. putoria*. In addition, we identified the constitutive heterochromatic regions of these species chromosomes using C-banding and located the nucleolar organizer regions

using *in situ* hybridization. The distribution of heterochromatin, location of NORs as well as the presence or not of sex chromosomes in different species of Muscoidea Diptera have been the main objective of all our last investigations.

Material and Methods

Flies - The colonies of *C. megacephala* and *C. putoria* were started from flies collected in putrid rat carcasses around the Institute of Biology at UNICAMP. The adults were kept in nylon cages (30x30x48 cm) at 24±2°C and 40-50% relative humidity on a 12h light/dark cycle in the Entomology laboratory of the Department Parasitology. The adults had access to sugar cane 24 h/day and to ground beef a few hours/day. Water was always available.

Chromosome preparation - Mitotic chromosomes were obtained from the brains of L3 larvae. Meiotic chromosomes were obtained from the testis cells of young males. Hypotonic treatment and fixation were performed as described by IMAI *et al.* (1988).

Chromosome morphology - For morphological studies, the slides were stained mainly with 10% Giemsa. Mean descriptive values of the karyotype were calculated from the information obtained from a minimum of one well-spread mitotic metaphase plate from each of 5-10 individuals. The nomenclature of LEVAN *et al.* (1964) was used to describe the chromosome morphology.

C-banding - SUMNER's technique (1972) was used with slight modification of temperature to allow the localization of constitutive heterochromatic regions.

FISH - *In situ* hybridization was performed in meiotic cells using a 12kb rDNA probe (pDm 238-*Drosophila melanogaster*). Chromosome preparations were pretreated with RNase, dehydrated in an ethanol series and air dried. The preparations were then denatured in 70% formamide solution (formamide in 20% 10xSSC) at 70°C for 2 min and immediately dehydrated in cold ethanol. The hybridization was performed for at least 16 h in a humid chamber at 37°C.

The slides were washed twice in 50% formamide solution (in 2xSSC), twice in 2xSSC for 5 min each and then incubated with the first antibody (antibiotin) in a humid chamber at 37°C for 45 min. After washing in PBT (PBS 1x, 0.1% Tween 20

and 0.4% BSA 30%, w/v), the slides were incubated with the second antibody (RAG-FITC) for 45 min in a humid chamber at 37°C.

Following a final wash in PBT, the slides were stained with propidium iodide and mounted in anti-fading. The probe was labeled using a Bionik kit (Gibco-nick translation) and denatured for 10 min at 100°C immediately before hybridization.

After *in situ* hybridization, some slides were washed in water for 2 h and stained with Giemsa for better morphological identification of each chromosome and to ascertain the exact location of the signal (VIEGAS-PEQUIGNOT, 1992).

All slides were examined using an Olympus fluorescence microscope and photographed with 400 ASA color negative film.

Results

The *Chrysomya putoria* (Figs. 1 -5) and *C. megacephala* (Figs. 6 and 7) karyotypic complements consist of five autosomal pairs and one pair of sex chromosomes (females XX/ males XY).

All the chromosomes of both species are metacentric (Table I), except for the X chromosome of *C. megacephala* which is subtelocentric. Analysis of the total chromosome length (TCL) show no significant difference in karyotype length (*C. megacephala*, 36.8 μm ; *C. putoria*, 37.8 μm).

The X chromosome of *C. putoria* is 1.4 times longer than that of *C. megacephala* and in both species the Y chromosome is much shorter than the X chromosome.

One of the X chromosomes from female *C. putoria* show a satellite at the end of the short arm similar to that seen in male X chromosomes (Figs. 1-4). Some preparations also show a secondary constriction in the long arm of the X chromosome of *C. megacephala* (Fig. 6).

All the autosomes of both species show a C band in the pericentromeric region (Figs. 3-7). A small interstitial band is also present in chromosome III of *C. putoria* and is probably related to a secondary constriction region (Fig. 5; arrow).

The X chromosomes of *C. putoria* are heterochromatic, except for a small region located at the end of the long arm (Fig. 3, 4). A similar C-band pattern was seen in the X chromosome of *C. megacephala* which also has a terminal region that is not C-banded (Figs. 6, 7). The Y chromosome of both species is totally heterochromatic.

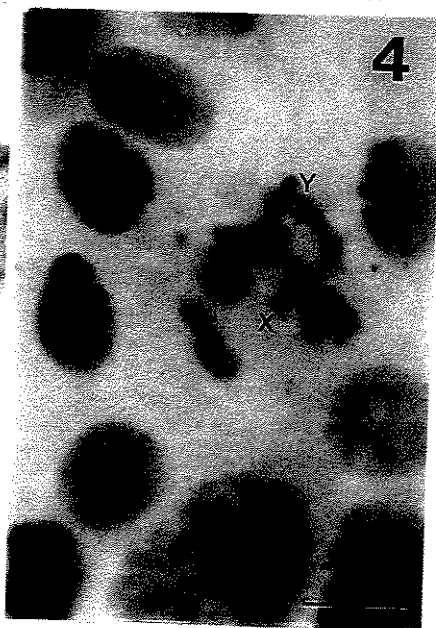
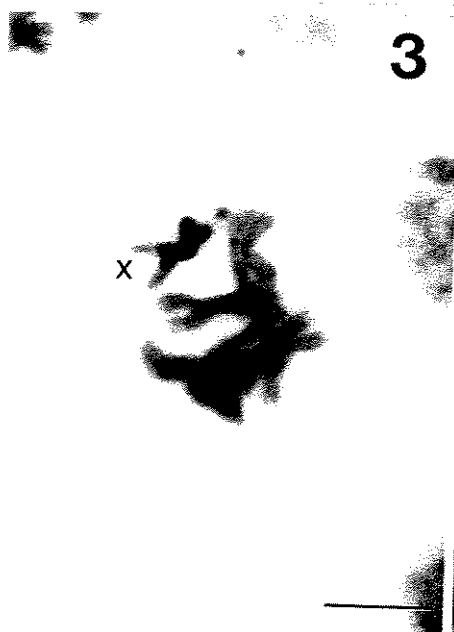
In situ hybridization show that there is a NOR on the sex chromosomes of both species (Figs. 8, 9). The sex chromosomes assumes an allocyclic behavior typical of heterochromatic chromosomes at meiosis (Figs. 8, 9), and for this reason we could not be certain whether the signal was located on X, Y or both chromosomes.

Table I. Analysis of the somatic complements of *C. megacephala* and *C. putoria*. The relative length of Y was expressed as a function of the length of X.

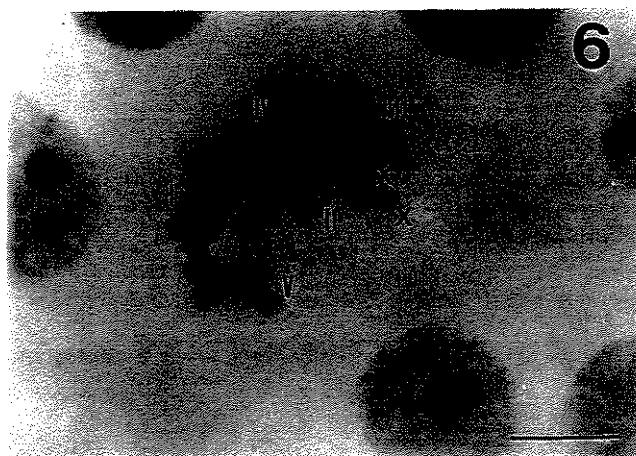
	<i>C. megacephala</i>							<i>C. putoria</i>						
Chromosomes	I	II	III	IV	V	X	Y	I	II	III	IV	V	X	Y
Length (µm)	7.5	7.1	6.2	6.1	5.5	4.4	2.5	7.5	6.8	6.3	5.7	5.4	6.1	1.8
Arm ratio	1.3	1.3	1.4	1.4	1.3	4.1	1.4	1.3	1.2	1.2	1.5	1.2	1.2	1.0
Relative length	0.20	0.19	0.17	0.16	0.15	0.13	0.07	0.20	0.18	0.17	0.15	0.14	0.16	0.05
Designation	M	M	M	M	M	St	M	M	M	M	M	M	M	M

M: metacentric; St: subtelocentric

Figs. 1-5: C-banded mitotic chromosomes of *C. putoria*. All the autosomes exhibit somatic pairing. 1: Mitotic female metaphase showing 12 chromosomes; 2: Mitotic male metaphase. 3, 4: Note the banded pericentromeric regions. The Y chromosome is totally heterochromatic and the X chromosomes show a terminal region C banded negative. The arrow in figure 5 shows an interstitial band in pair III. Scale bar = 10 μm .



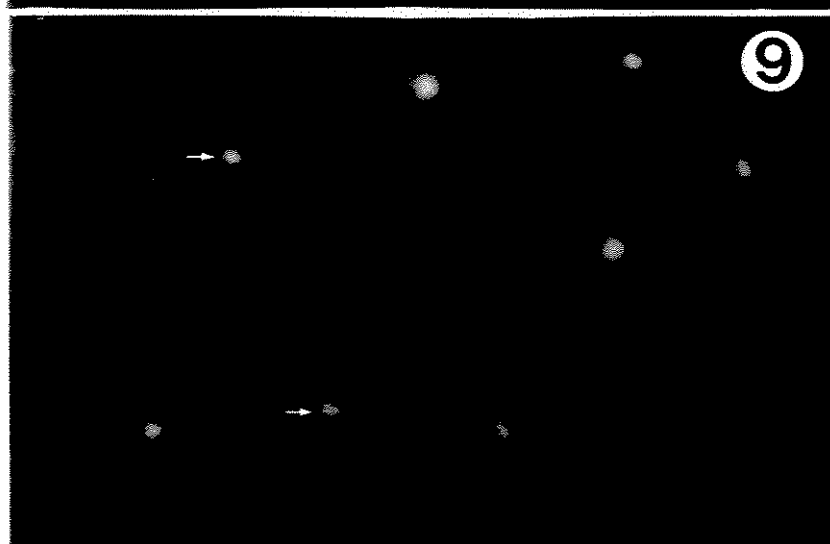
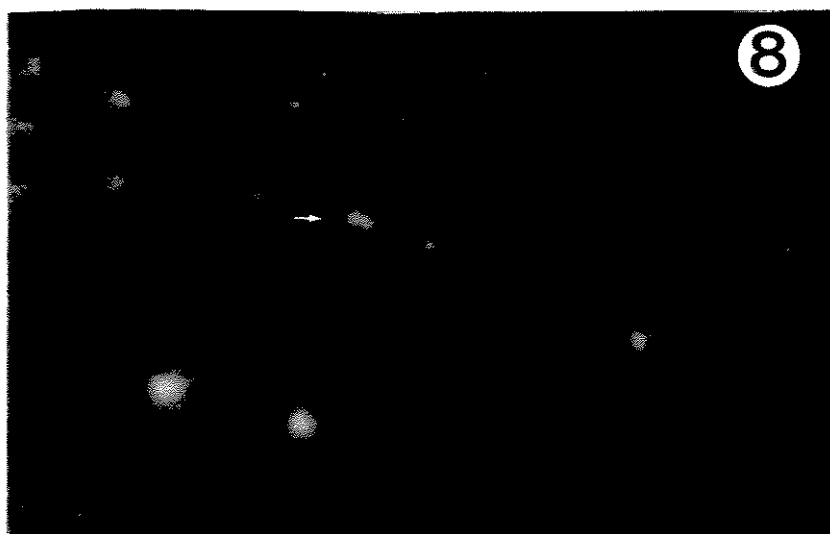
Figs. 6 and 7: C-banded mitotic chromosomes of *C. megacephala*. 6: Mitotic female chromosomes. 7: Mitotic male chromosomes. The autosomes exhibit somatic pairing. The Y chromosome is totally heterochromatic and the X chromosomes are partially heterochromatic. Scale bar = 10 μ m.



7



Fig. 8: FISH in *C. putoria* meiotic chromosomes. Fig. 9: FISH in *C. megacephala* meiotic chromosomes. The white arrows indicates the FISH signal in the sex chromosomes. The hybridization signal is yellow, whereas the chromosomes and nuclei are counterstained with propidium iodide (red).



Discussion

Chrysomya putoria is morphologically very similar to *C. chloropyga*. Based on the similarity of males genitalia ZUMPT (1956) concluded that *C. putoria* was variant of *C. chloropyga* which he classified as *C. chloropyga* form *putoria*. However, subsequent crossing experiments showed that these flies were at least partly genetically isolated and merited species status (ZUMPT, 1975). BOYES & SHEWELL (1975) and ÜLLERICH (1976) considered these species to be distinct based on their cytogenetic characteristics, and this is the currently accepted view.

AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983) considered the karyotypic data of *C. chloropyga* to be more similar to those described by ÜLLERICH (1976) for *C. chloropyga* than for *C. putoria*. However, there are very subtle differences between the karyotypes described by ÜLLERICH (1976) for *C. putoria* and *C. chloropyga*. This author differentiated the two species on the basis of two features present only in *C. putoria*: an interstitial C band in chromosome III and a secondary constriction in the Y chromosome. An interstitial band was indeed observed in the population we studied but in agreement with AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983), no constriction of the Y chromosome was present.

Our data on chromosome morphology differed from ÜLLERICH (1976) only for pair II, which he considered submetacentric in *C. putoria* and *C. chloropyga*, although no arm ratios were reported.

Our data on the gross morphology were more similar to those of BOYES & SHEWELL (1975) for a population from Johannesburg, in which all the autosomes were metacentric, than to those of other authors (ÜLLERICH, 1976; AZEREDO-SPIN & PAVAN, 1983).

Secondary constrictions were found only in chromosome III. BOYES & SHEWELL (1975) reported no such constriction, whereas ÜLLERICH (1976) observed secondary constrictions in chromosomes II and III of both *C. putoria* and *C. chloropyga*. AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983) reported one secondary constriction on chromosome III and possibly one on chromosome II.

The C-banding pattern of *C. putoria* observed here was very similar to that described by ÜLLERICH (1976) with pericentromeric bands in all autosomes,

interstitial bands in chromosome III and totally heterochromatic Y and X chromosomes except for a distal part of the long arm of the latter.

Thus comparison of our data on chromosome morphology with those of BOYES & SHEWELL (1975) and ÜLLERICH (1976) and with the C-banding pattern provided by ÜLLERICH (1975) together with more recent studies indicates that the species introduced into Brazil was *C. putoria*.

The autosome lengths observed for *C. megacephala* were very similar to those that found by AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983) for populations from the same region (Campinas, Brazil). However, the latter authors found a secondary constriction in pairs I, III and IV (corresponding to VI, IV and III respectively of those author's) which was not observed here. *C. megacephala* from Japan also shows a secondary constriction in pair III (ÜLLERICH, 1963). BOYES & SHEWELL (1975) found no such constriction in populations from Australia. In the present study, a secondary constriction was seen in chromosome X, although AZEREDO-SPIN & PAVAN (1983) and ÜLLERICH (1963) report no such structure. Our results showed that this chromosome is subtelocentric, which agree with these authors. In strains from Australia, the X chromosome is telocentric, with a secondary constriction. The divergence between these two Brazilian populations most likely appeared after the introduction and establishment of *C. megacephala* in this country.

Among the Calliphoridae studied to date, including most *Chrysomya* species, the sex chromosomes are medium length heterochromatic chromosomes, and the sex is probably controlled by a determinant male factor present in the Y chromosome (ÜLLERICH, 1963, 1976; BEDO, 1991).

However, variations in sex chromosome size were reported by BOYES & SHEWELL (1975) for *C. putoria* populations. We also observed variations in the absence and presence of a secondary constriction in X chromosomes. Variations in this chromosome were described by ÜLLERICH (1961, 1963, 1971, 1973, 1976), and MELANDER (1963) described some Calliphoridae species in which the sex chromosomes were not morphologically differentiated (XX/XY). Indeed, the smallest chromosome pair in species such as *C. albiceps* and *C. rufifacies* are not the sex chromosomes. ÜLLERICH (1973, 1976) believed that the sex chromosomes had been lost in *C. rufifacies* and that sex was determined by another pair of chromosomes.

BOYES & SHEWELL (1975) stated that the small heterochromatic pair in *C. rufifacies* populations corresponded to the sex chromosomes.

In many insects, including the higher Diptera, secondary constrictions and NORs are located together in heterochromatic sex chromosomes (HADJIOLOV, 1985). ÜLLERICH (1963) described the karyotype of *Lucilia cuprina* and showed that the nucleolus was associated with secondary constrictions present in the X and Y chromosomes. Through *in situ* hybridization, BEDO (1992) detected a positive signal for rDNA in both sex chromosomes of *L. cuprina* and *Chrysomya bezziana*, and both regions were associated with the secondary constrictions. Similarly, in the present study, *in situ* hybridization located NORs in the sex chromosomes of *C. putoria* and *C. megacephala*. However, since these chromosomes assume an allocyclic behavior in meiosis, it was not possible to determine whether the signal was located on X, Y or both chromosomes.

NORs are not always located on the sex chromosomes. For instance, in *C. rufifacies* (same genus of the species we have investigated) the NOR is located on the small heterochromatic pair VI. In some Muscidae species, NORs occur on autosomes, even in species with sex chromosomes (PARISE & AVANCINI, unpublished data). In species such as *C. rufifacies*, the factors involved in sex determination may be located on another chromosome.

Comparison of the karyotype, C-banding pattern and sex chromosomes, shows that *C. megacephala* and *C. putoria* are very similar as would be expected for species of same genus. In contrast, *C. rufifacies*, which belongs to the same genus, showed a basic difference in that the NOR was located on an autosome.

FOSTER and collaborators (1980) stated that the linkage groups of *Musca domestica* (HIROYOSHI, 1977) and, possibly, *Drosophila* (STURTEVANT and NOVITSKI, 1941) may be homologous with *L. cuprina*. This raises the possibility that the linkage groups of the higher Diptera may have been conserved largely intact. The similarity of the karyotypes of the muscoid calyptrate Diptera, which have five autosomal pairs (BOYES, 1967), is consistent with this hypothesis (FOSTER *et al.*, 1980).

Acknowledgments

The authors thank Dr. S.M. Recco-Pimentel for use of the fluorescence photomicroscope and some of her laboratory facilities, Dr. A.P. Prado for his valuable information on the taxonomy and distribution of Calliphoridae and Dr. L. M. Botella from Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain for supplying the pDm. P.P.P.M. was the recipient a PhD studentship from CAPES.

Este trabalho será submetido à revista *Chromosome Research*.

References

- AZEREDO-SPIN, A. M. L. and PAVAN, C. (1983). Karyotypes and possible regions of origin of three species of Calliphoridae (Diptera) recently introduced in Brazil. *Rev. Bras. Genet.* **4**: 619-638.
- BEDO, D. G. (1991). Cytological characterization of heterochromatin in meiotic and mitotic chromosomes of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* **34**: 631-637.
- BEDO, D. G. (1992). Polytene chromosomes of the Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*) and its evolutionary relationships with *Lucilia cuprina* and *Cochliomya hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genome* **35**: 294-303.
- BOYES, J. W. and WILKES, A. (1953). Somatic chromosomes of higher Diptera I. Differentiation of tachinid parasites. *Can. J. Zool.* **31**: 125-165.
- BOYES, J. W. and VAN BRINK, J. M. (1965). Chromosomes of Calyptrate Diptera. *Can. J. Genet. Cytol.* **7**: 537-550.
- BOYES, J. W. (1967). The cytology of muscoid flies. In: Wright, J.W. and Pal, R., ed. *Genetics of insect vectors of disease*. W.H.O. Elsevier Publ. Co. Amsterdam, pp 371-384.
- BOYES, J. W. and SHEWELL, G. E. (1975). Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). *Genetica* **45**: 435-488.
- FOSTER, G. G.; WHITTEN, M. J.; KONOVALOV, C.; BEDO, D. G.; MADDERN, R. H. and BOON, D. J. (1980). Cytogenetic studies of *Lucilia cuprina dorsalis* R.-D. (Diptera: Calliphoridae). *Chromosoma* **81**: 151-168.
- GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P. and LINHARES, A. X. (1978). Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* **22**: 53-60.
- GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P. and BURALLI, G. M. (1980). Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Rob. Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* **23**: 249-255.
- GREENBERG, B. (1971). Ecology, classification and abiotic associations. In: *Flies and Disease*. Vol. 1, Princeton University Press, Princeton, p 856.

- GREENBERG, B. (1973). Biology and disease transmission. In: *Flies and Disease*. Vol. 2, Princeton University Press, Princeton, p 447.
- HADJIOLOV, A. A. (1985). *The nucleolus and ribosome biogenesis*. Springer-Verlag, Vienna.
- HIROYOSHI, T. (1977). Some new mutants and revised linkage maps of the housefly, *Musca domestica* L. *Jpn. J. Genet.* **52**: 275-288.
- IMAI, H. T.; TAKAHATA, N.; MARUYAMA, T.; DANIEL, A.; HONDA, T.; MATSUDA, Y. and MOTIWARI, K. (1988). Theoretical bases for karyotype evolution. II. The fusion burst in man and mouse. *Jpn. J. Genet.* **63**: 313-342.
- JAMES, M. T. (1970). Family Calliphoridae. In: *A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo **102**: 1-28.
- KENEUKE, W. (1924). Über die spermatogenese einiger Dipteren. *Z. Zell. Gewebelehre* **1**: 357-412.
- LAURENCE, B. R. (1981). Geographical expansion of the range of *Chrysomya* blow flies. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **75**: 130-131.
- LAURENCE, B. R. (1986). Old World blow flies in the New World. *Parasit. Today* **2**: 77-79.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. and SANDBERG, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **57**: 201-220.
- MARILUIS, J. C. (1980). Presencia del género *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, 1830 em la region Neotropical (Calliphoridae, Chrysomyiinae, Chrysomyiini). *Res. Soc. Ent. Argentina* **39**: 126.
- MELANDER, Y. (1963). Chromatid tension and fragmentation during the development of *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera). *Hereditas* **49**: 91-106.
- METZ, C. A. (1916). Chromosome studies on the Diptera. II. The paired association of chromosomes in the Diptera and its significance. *J. Exptl. Zool.* **21**: 213-279.
- METZ, C. A. (1922). Association of homologous chromosomes in tetraploid cells of Diptera. *Biol. Bull.* **43**: 369-373.

- PRADO, A. P. and GUIMARÃES, J. H. (1983). Estado atual da distribuição e dispersão das espécies do gênero *Chrysomya* R. -D. na região Neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* **26**: 225-231.
- STEVENS, N. M. (1908). A study of the germ cells of certain Diptera, with reference to the heterochromosomes and phenomena of synapsis. *J. Exptl. Zool.* **5**: 359-374.
- STURTEVANT, A. H. and NOVITSKI, E. (1941). The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics* **26**: 517-541.
- SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**: 304-306.
- ÜLLERICH, F. H. (1961). Geschlechtsbestimmung bei der Fliege *Phormia regina*. *Naturwissenschaften* **48**: 559-560.
- ÜLLERICH, F. H. (1963). Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmung bei einigen (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma* **14**: 45-110.
- ÜLLERICH, F. H. (1971). Sex-linkage and sex determination in a monogenic blowfly. *Nature* **58**: 626.
- ÜLLERICH, F. H. (1973). Die genetische Grundlage der Monogenie bei der Schmeißfliege *Chrysomya rufifacies* (Calliphoridae, Diptera). *Mol. Gen. Genet.* **125**: 157-172.
- ÜLLERICH, F. H. (1976). Chromosomenverhältnisse, konstitutives heterochromatin und geschlechtsbestimmung bei einigen Arten der Gattung *Chrysomya* (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma* **58**: 113-136.
- VIEGAS-PEQUIGNOT, E. (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willman D, ed. *In situ hybridization: practical approach*. Oxford University Press, IRL Press, pp 137-158.
- ZUMPT, F. (1956). Calliphoridae (Diptera Cyclorrhapha). Part I: Calliphorini and Chrysomyiini. Explor. Parc. Nat. Albert, Miss de Witte p 87.
- ZUMPT, F. (1965). Myiasis in man and animals in the old World. Butterworths, London, pp 88-99.

ZUMPT, F. (1972). Notes on Diptera (Sarcophagidae, Calliphoridae) from the Ethiopian geographical region. *Z. Angew. Zool.* **59**: 439-445.

Cytogenetics of the Neotropical Fleshfly *Pattonella intermutans* (Diptera, Sarcophagidae)

Patricia P. Parise-Maltempi & Rita M. P. Avancini

P.P. Parise-Maltempi and R.M.P. Avancini*, Department of Cell Biology and *Department of Parasitology, Institute of Biology, P.O. Box 6109, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Patricia P. Parise-Maltempi. Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970 Campinas, SP Brasil.

Phone: +55 19 7887786. Fax: +55 19 7887821.

E-mail: parise@obelix.unicamp.br

Abstract

The karyotype of *Pattonella intermutans* is described in detail. This species has $2n=12$ chromosomes; three metacentric and two submetacentric pairs of autosomes and an XX/XY sex chromosome pair. The autosomes are characterized by the presence of C band in the pericentromeric region and the sex chromosomes are totally heterochromatic. FISH technique showed the NOR to be located in autosome IV.

Introduction

Flies of the family Sarcophagidae are extremely common insects with a worldwide distribution. These flies have an extensive variety of alimentary habits during the larval phase, the most common of which involves animal carcasses (JAMES, 1947).

Most reports on the Sarcophagidae deal with their medical importance and role in the degradation of larval substrate or carrion (CORNABY, 1974; JAMES, 1947; JIRON and MARIN, 1982).

Members of the Sarcophagidae and Calliphoridae are the main invertebrate consumers of vertebrate carcasses (BRAACK, 1987). *Pattonella intermutans* is reported to be a good forensic indicator in carcass in the region of Campinas, Brazil (CARVALHO, 1996). The distribution of this species is Neotropical (Brazil, Costa Rica, Equator, Guatemala, Guyana, Honduras, Mexico, Panama, Paraguay, Peru, Sta. Lucia, Trinidad & Tobago) (PAPE, 1996).

Previous investigations on the karyotype of some species of Sarcophagidae have revealed that the size of the sex chromosomes varies greatly from species to species (STEVENS, 1908; METZ, 1916; 1922; KENEUEKE, 1924; BOYES, 1953; 1963; BOYES and VAN BRINK, 1965; KAUL *et al.*, 1978; TEWARI *et al.*, 1983). In contrast, the gross morphology of the autosomes is rather uniform throughout the family.

The present investigation is part of a more comprehensive project aimed at studying the cytogenetics of different species of Muscoidea by comparing the general morphology and number of their chromosomes, particularly the sex chromosomes, and their nucleolar organizing regions (NORs).

Here, we describe the chromosomal morphology of this Neotropical species compared to the standard profile for the Sarcophagidae.

Material and Methods

Fly rearing: Flies were maintained in the Entomology section of the Department of Parasitology, State University of Campinas (UNICAMP). The colony was started

from flies collected in rat carcasses around the Biology Institute at UNICAMP. The adults were kept in nylon cages (30x30x48cm), at 24±2°C and, 40-50% relative humidity on a 12 h light/dark cycle. The flies were fed sugar cane and water 24 hour/day.

Chromosome preparation: Mitotic chromosomes were obtained from the brains of L3 larvae. Meiotic chromosomes were obtained from the testis cells of young males. Hypotonic treatment and fixation were performed as described by IMAI *et al.* (1988).

Chromosome morphology: For morphological studies, the slides analyzed were mainly those stained with 10% Giemsa. Mean descriptive values of the karyotype were calculated from information obtained from a minimum of one well-spread mitotic metaphase plate from each of 10 individuals. The nomenclature of LEVAN *et al.* (1964) was used to describe the chromosome morphology.

C-banding: It was performed the SUMNER's technique (1972) with slight modification to allow the localization of constitutive heterochromatin regions.

FISH: *In situ* hybridization was performed on mitotic and meiotic cells, using a 12Kb rDNA probe (pDm 238-*Drosophila melanogaster*). Chromosome preparations were pretreated with RNase, dehydrated in an ethanol series and air-dried. The preparations were then denatured in formamide solution 70% (formamide in 20% 10xSSC) at 70°C, for 2 min and immediately dehydrated in cold 50%, 75% and absolute ethanol. The hybridization was performed for at least 16 h, in a humid chamber, at 37°C.

The slides were washed twice in 50% formamide solution (in 2xSSC) and twice in 2xSSC for 5 min each. The slides were incubated with the first antibody (antibiotin) in a humid chamber at 37°C for 45 min. After washing in PBT (PBS 1x, 0.1% Tween 20 and 0.4% BSA 30% w/v), the slides were incubated with the second antibody (RAG-FITC) for 45 min in a humid chamber at 37°C. Following a final wash in PBT, the slides were stained in propidium iodide and mounted with anti-fading.

The probe was labeled using the bionik kit (Gibco-nick translation) and denatured for 10 min at 100°C immediately before the hybridization.

After *in situ* hybridization, some slides were washed in water for 2 h and stained with Giemsa for better morphological identification of each chromosome and to ascertain the exact location of the signal (VIEGAS-PEQUIGNOT, 1992).

The slides were examined using an Olympus fluorescence microscope and photographed with 400 ASA color negative film.

Results

Karyotype morphology

The *P. intermutans* karyotypic complement consists of five autosomal pairs and one pair of sex chromosomes XX/XY (females XX/ males XY) (Figs. 1, 2). Morphometric analysis of mitotic chromosomes confirm that pairs I, III and V are metacentric and pairs II and IV are submetacentric (Table 1).

Pair I is the longest autosome of the complement and is just slightly bigger than pair II. Chromosome I is the only one of the complement with a distinct space in the centromeric region (Fig. 1: arrow). Pairs III and IV are similar in length, making it difficult to distinguish between them. Pair V is smaller than any other pair, and corresponds to 11% of the total complement length (TCL).

Chromosome X is subtelocentric and the longest of the whole complement; the Y chromosome is submetacentric and just half the size of X. Chromosomes X and Y appear heteropycnotic after conventional staining (Figs. 1, 2).

C Band

All the autosomes have big blocks of heterochromatin in the pericentromeric region (Figs. 3-6).

After C-banding, a big pericentromeric block is very noticeable in pair I, and is an unmistakable characteristic of that chromosome. This pair usually exhibits the most prominent band of the complement and its distribution around the centromere is asymmetric (Figs. 3, 6: arrows).

In addition to the pericentromeric band, pair II shows an intercalary band on the long arm that is shorter and lighter than the pericentromeric band (Figs. 4, 5). There is a large pericentromeric band on the small arm of pair IV and a minute pericentromeric band on the long arm (Fig. 6).

The sex chromosomes seems totally heterochromatic. In some metaphases, the X (Fig. 3) and Y (Figs. 3, 5) chromosomes show different band intensities. Previous analysis using restriction endonucleases have also shown bands with different intensities, possibly indicating different classes of heterochromatin (data not shown).

C-banding in meiotic chromosomes (Fig. 6) shows the same bands seen in mitotic chromosomes. The X and Y chromosomes show an allocyclic behavior typical of heterochromatic chromosomes at meiosis (Fig. 6: arrowhead).

***In situ* hybridization**

In situ hybridization, in meiotic chromosomes, with a rDNA probe showed that the NOR is located on autosome pair IV (Fig. 7).

The intense signal, seen in both homologs, coincided with the location of the big block of heterochromatin present in this chromosome pair, as described above (Fig. 6).

Table 1. Data from analysis of the somatic complements of *P. intermutans*. The relative length of Y was expressed as a function of the length of X. N=10.

Chromosome	I	II	III	IV	V	X	Y
Length (μm)	5.3	4.5	3.9	3.8	2.9	7.7	3.4
Arm ratio	1.23	1.91	1.45	1.75	1.16	3.32	2.1
Relative length	0.19	0.16	0.14	0.14	0.11	0.26	0.12
Designation	M	Sb	M	Sb	M	St	Sb

M: metacentric; Sb: Submetacentric; St: subtelocentric.

Figs. 1, 2: Mitotic chromosomes in *P. intermutans*. 1: Mitotic male metaphase showing 12 chromosomes; 2: Mitotic female metaphase. All the autosomes exhibit somatic pairing. Arrow in figure 1 shows the space in the centromeric region of pair I. Scale bar= 10 μ m.

Figs. 3-6: C-banded chromosomes in *P. intermutans*. 3-5: Mitotic chromosomes. 6: Meiotic chromosomes. Arrow in Fig. 3 and 6 show a big band in pair I. In Fig. 4 a small interstitial band is seen in pair II. The autosomes show pericentromeric C bands and the sex chromosomes are totally heterochromatic. Arrowhead in Figure 6 shows allocyclic behaviour for heterochromatic chromosomes. Scale bar= 10 μ m.

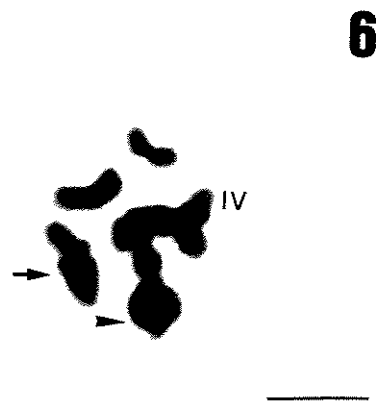
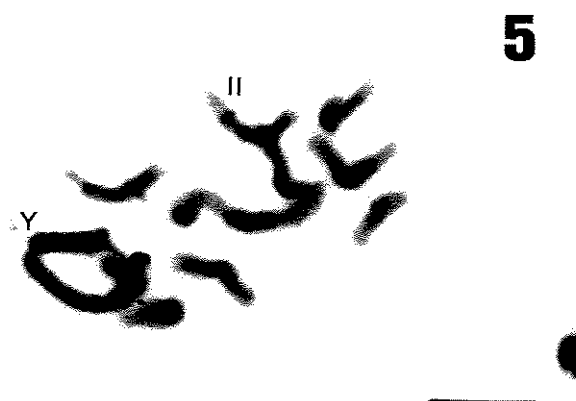
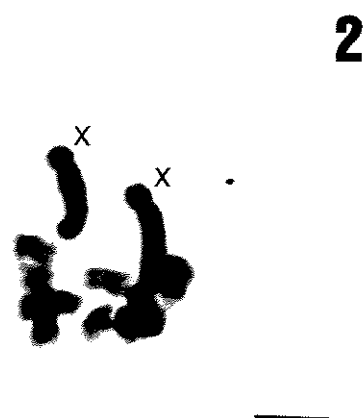
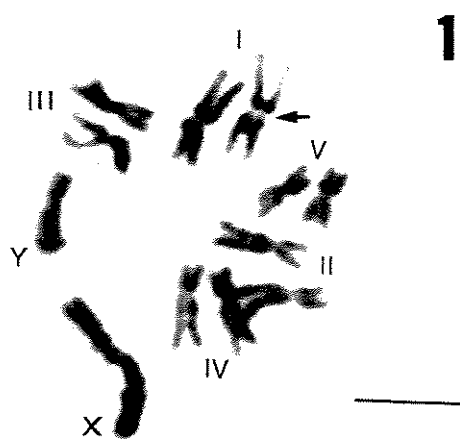


Fig. 7: FISH of *P. intermutans* chromosomes using a *Drosophila* rDNA probe. White arrow indicates the FISH signal in pair IV. The hybridization signal is yellow, whereas the chromosomes and nuclei are counterstained with propidium iodide (red).



Discussion

The modal number of chromosomes among species of the family Sarcophagidae is $2n=12$. Only *Pseudosarcophaga affinis* is exceptional in having $2n=19/20$ and chromosomes of unusual morphology (BOYES, 1953).

Previous studies of the karyotypes in this family (METZ, 1916; BOYES, 1953; BOYES, 1963; KAUL *et al.*, 1978) have shown that the size of the sex chromosomes varies considerable among the species, as also occurs for other dipteran groups (BOYES and BOYES, 1975; KAUL and TEWARI 1979; PARISE, unpublished data).

The results of our analysis of the karyotype of *P. intermutans* fit this pattern of autosomal and sex chromosomal organization.

In agreement with reports (BOYES, 1953; 1963) for the subfamily Sarcophaginae (*Helicobia sp.*, *Helicobia rapax*, *Neobelliera bullata*, *Sarcophaga carnaria* and *Sarcophaga exuberans*, among others) there was little difference in the relative lengths and arm ratios among the autosomes. This feature was first noted by BOYES and VAN BRINK (1965) and by KAUL *et al.* (1978) and GAUR *et al.* (1984). This similarity supports the argument that the autosomes of the Sarcophagidae retain a high degree of structural integrity and may have differentiated by structural rearrangements, which did not affect the gross morphology of the chromosomes (KAUL *et al.*, 1978). In contrast, the sex chromosomes exhibit considerable variation in size and morphology and their length does not correlate with total autosome length. The constancy of the total autosome length and the variability of the sex chromosomes strengthen the hypothesis that great modifications in the sex chromosomes do not cause a loss or gain in autosomal material.

Big blocks of constitutive heterochromatin characterize the chromosomes of *P. intermutans*, and the sex chromosomes are totally heterochromatic. C-banding show variably stained segments along the length of these chromosomes. KAUL *et al.* (1978) reported differential staining in the sex chromosomes of *Parasarcophaga spp* and suggested that large changes in the size of the sex chromosomes must have taken place by the accumulation or deletion of heterochromatin. This variation was both quantitative and qualitative since there were some segments differentially stained. Euchromatic segments have not been as well studied as heterochromatic segments.

Euchromatic segments have played a relatively minor role in chromosomes events and the karyotype has evolved mainly through changes in the amount, nature and distribution of heterochromatic segments.

Heterochromatin has a significant role in the evolution of sex chromosomes. The incorporation of inert heterochromatin can represent an initial phenomenon in the specialization of sex chromosomes (JOHN, 1988; Review JABLONKA and LAMB, 1990). According to the model described by MULLER (1932), morphologically distinct sex chromosomes would have evolved from normal, homomorphic autosomes. One typical process during the progression to heteromorphic sex chromosomes is the heterochromatinisation of one of the two sex chromosomes in the heterogametic sex (OHNO, 1967; for review see JOHN, 1988).

During heterochromatinisation, the original sequences undergo dramatic changes, genes degenerate to pseudogenes, the chromosomal region acquires all kinds of transposable elements and DNA segments are duplicated (STEINEMANN and STEINEMANN, 1992). At the end of the process, one of the two sex chromosomes may become heterochromatic, the number of functional genes may be drastically reduced and, in the extreme case, the only genes that remain functional are those involved in fertility, as is the case in *Drosophila* (for review see HENNIG, 1986).

With sex chromosomes of different sizes (big, as in *Pattonella intermutans*, or small, as in *Parasarcophaga spp*) there may be a move towards total loss of the sex chromosomes, as in some species of the family Muscidae, or to an accumulation of parts of autosomes, thereby increasing in size.

Ribosomal DNA is extremely conserved among diptera species and NORs are therefore good markers for studying karyotypic evolution. In most studied so far, the NOR(s) are located in the sex chromosomes (BEDO and HOWELLS, 1987; BEDO and WEBB, 1989; WILLHOEFT and FRANZ, 1996; WILLHOEFT, 1997). KAUL and collaborators (1989) applied the N-banding technique to six species of *Parasarcophaga* and obtained similar results to C banding for all the chromosomes, although they were not able to distinguish between C bands and NORs. The detection of NORs by conventional techniques may be difficult, mainly because of the lack of specificity of these techniques. The use of *in situ* hybridization can circumvent these limitations and was useful for detecting the location of the NOR in *P. intermutans*. In this case, the NOR was not located on the sex chromosomes, but in autosome IV,

close to a big block of constitutive heterochromatin. This may be further evidence of an intermediary stage in the evolution of sex chromosomes, with important sequences of the genome moving to other sites to avoid drastic consequences, associated with the loss of part of the sex chromosomes.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. A.P.Prado for his help with the identification of the flies and Ms. C.A.M.Patiu for information on Sarcophagidae taxonomy. We also thank Dr. S.M.Recco-Pimentel and Dr. H.F.Carvalho for the use of the fluorescence photomicroscopy. P.P.P.M. received a PhD fellowship from CAPES.

References

- BEDO, D.G. and HOWELLS, A.J., 1987. - *Chromosomal localization of the white gene of Lucilia cuprina (Diptera: Calliphoridae) by in situ hybridization*. Genome, 29: 72-75.
- BEDO, D.G. and WEBB, G.C., 1989. - *Conservation of nucleolar structure in polytene tissues of Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae)*. Chromosoma, 98: 443-449.
- BOYES, J.W., 1953. - *Somatic chromosomes of higher Diptera. II. Differentiation of Sarcophagidae species*. Can. J. Zool., 31: 561-576.
- BOYES, J.W., 1963. - *Somatic chromosomes of higher Diptera. VII. Sarcophagidae species in relation to their taxonomy*. Can. J. Zool., 41: 1191-1204.
- BOYES, J.W. and BOYES, B.C., 1975. - *Chromosomes of Lauxaniidae and Chamaemyiidae (Diptera)*. Genetica, 45: 273-287.
- BOYES, J.W. and VAN BRINK, J.M., 1965. - *Chromosomes of calyptrate Diptera*. Can. J. Genet. Cytol., 7: 537-550.
- BRAACK, L.E.O., 1987. - *Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical African woodland*. Oecologia, 72: 402-409.
- CARVALHO, L.M.L., 1996. - *Sucessão e ecologia de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em ambiente natural de mata mesófila semidecídua*. M. Sc thesis, University of Campinas, UNICAMP, Campinas.
- CORNABY, B.W., 1974. - *Carrion reduction by animals in contrasting tropical habitats*. Biotropica, 6: 51-63.
- GAUR, P.; AGRAWAL, U.R.; TEWARI, R.R. and KAUL, D., 1984. - *Heterogeneity of the sex chromosomes heterochromatin in the genus Parasarcophaga (Sarcophagidae, Diptera)*. La Kromosomo II, 39/40: 1207-1213.
- HENNIG, W., 1986. - *Heterochromatin and germ line-restrict DNA*. In: Results and Problems in Cell Differentiation. Germ line-soma differentiation, ed. By W. Hennig, Springer-Verlag, Berlin, pp. 175-192.

- IMAI, H.T.; TAKAHATA, N.; MARUYANA, T.; DANIEL, A.; HONDA, T.; MATSUDA, Y. and MOTIWARI, K., 1988. - *Theoretical bases for karyotype evolution. II. The fusion burst in man and mouse*. Jpn. J. Genet., 63: 313-342.
- JABLONKA, E. and LAMB, M.J., 1990. - *The evolution of heteromorphic sex chromosomes*. Biol. Rev., 65: 249-276.
- JAMES, M.T., 1947. - *The flies that cause myiasis in man*. U.S. Depart. Agriculture. Misc. Publ., 631: 175p.
- JIRÓN, L.F. and MARIN, R.E., 1982. - *Moscas sarcófagas da Costa Rica (Diptera; Cyclorrhapha)*. Rev. Biol. Trop., 30: 105-106.
- JOHN, B., 1988. - *The biology of heterochromatin*. In: Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects, ed. by R.S. Verma. Cambridge University Press, Cambridge, pp.1-147.
- KAUL, D.; GAUR, P.; AGRAWAL, U.R. and TEWARI, R.R., 1989. - *Characterization of Parasarcophaga heterochromatin*. Chromosoma, 98: 49-55.
- KAUL, D. and TEWARI, R.R., 1979. - *The chromosomes of Passeromyia heterochaeta Villeneuve (Muscidae: Diptera)*. Experientia, 35: 1155-1156.
- KAUL, D.; CHATURVEDI, R.; GAUR, P. and TEWARI, R.R., 1978. - *Cytogenetics of the genus Parasarcophaga (Sarcophagidae: Diptera)*. Chromosoma, 68: 73-82.
- KENEUCHE, W., 1924. - *Über die spermatogenese einiger Dipteren*. Z. Zellenlehre, 1: 357-412.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. and SANDBERG, A.A., 1964. - *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. Hereditas, 57: 201-220.
- METZ, C.W., 1916. - *Chromosome studies on Diptera. II. The paired association of chromosomes in Diptera and its significance*. J. Exp. Zool., 21: 213-280.
- METZ, C.W., 1922. - *Association of homologous chromosomes in tetraploid cells of Diptera*. Biol. Bull., 43: 369-373.
- MULLER, H.J., 1932. - *Further studies on the nature and causes of gene mutation*. Proc. 6th Int. Congr. Genet. 1: 213-255.
- OHNO, S., 1967. - *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag, Berlin.

- PAPE, T., 1996. - *Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Diptera)*. Mem. Entom. Int., 8: 1-558, Gainesville.
- STEINEMANN, M. and STEINENMANN, S., 1992. - *Degenerating Y chromosome of Drosophila miranda: a trap for retroposons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 7591-7595.
- STEVENS, N.M., 1908. *A study of the germ of certain Diptera with special reference to the heterochromosomes and the phenomenon of synapsis*. J. Exp. Zool., 5: 359-374.
- SUMNER, A.T., 1972. - *A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin*. Exp. Cell Res., 75: 304-306.
- TEWARI, R.R.; AGRAWAL, U.R. and KAUL, D., 1983. - *Heterochromatin polymorphism in Parasarcophaga misera (Sarcophagidae: Diptera)*. Nucleus, 26: 188-191.
- VIEGAS-PEQUIGNOT, E., 1992. - *In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes*. In: . *In situ hybridization: practical approach*, D. Willman, ed. Oxford University Press, IRL Press.
- WILLHOEFT, U., 1997. - *Fluorescence in situ hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse flies (Diptera: Glossinidae: Glossina)*. Chrom. Res. 5: 262-267.
- WILHOEFT, U. and FRANZ, G., 1996. - *Comparison of the mitotic karyotypes of Ceratitis capitata, Ceratitis rosa, and Trirhithrum coffeae (Diptera: Tephritidae) by C-banding and FISH*. Genome, 39: 884-889.

Este trabalho será submetido à revista *Caryologia*.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Os cromossomos sexuais estão presentes nos Muscídeos *Ophyra chalcogaster* (Subfamília Azeliinae), *Synthesiomyia nudiseta* (Subfamília Reinwardtiinae) e *Musca domestica* (Subfamília Muscinae), nos Califorídeos *Chrysomya putoria* e *C. megacephala* e no Sarcófagídeo *Pattonella intermutans*. As espécies *Muscina stabulans* (Subfamília Reinwardtiinae) e *Haematobia irritans* (Subfamília Muscinae) são Muscídeos considerados exceções por apresentarem cinco pares de cromossomos e ausência do par sexual. Com exceção de *M. domestica* todas as espécies possuem o par sexual heteromórfico.
- Os cromossomos sexuais de todas as espécies de Muscidae estudadas são metacêntricos, assim como os de *C. putoria*. *Chrysomya megacephala* e *P. intermutans* possuem o X subtelocêntrico e o Y de *P. intermutans* é submetacêntrico. Estes cromossomos são totalmente heterocromáticos nos Muscídeos e no Sarcófagídeo e parcialmente heterocromáticos nas espécies de Califorídeos.
- Foi encontrada considerável diferença com relação ao tamanho dos cromossomos sexuais. Estes são muito pequenos em *O. chalcogaster*, médios em *M. domestica* e nas espécies de *Chrysomya* e muito grandes em *S. nudiseta* e *Pattonella intermutans*. O comprimento total do genoma, excluindo o cromossomo X, é semelhante nos Muscídeos *M. domestica*, *S. nudiseta*, *M. stabulans* e *H. irritans*. Esta similaridade indica que o que faz o genoma das espécies com cinco pares de cromossomos ser menor do que o das espécies onde o X está presente é realmente a ausência dos cromossomos sexuais.
- As regiões organizadoras do nucléolo foram localizadas através da técnica de FISH. A NOR está localizada no par II de *M. stabulans* e *M. domestica*, no par III de *S. nudiseta*, no par IV de *P. intermutans* e nos cromossomos sexuais de *C. putoria* e *C. megacephala*. Nas espécies onde as NORs estão localizadas nos autossomos (com exceção de *M. domestica*) há uma coincidência destas com bandas intercalares de heterocromatina constitutiva. Uma vez que NORs em dípteros estão normalmente associadas aos cromossomos sexuais, o fato de estarem localizadas nos autossomos de algumas espécies poderia ser interpretado como um passo intermediário na evolução cariotípica, onde algumas seqüências do

genoma, no caso a NOR, poderiam ter mudado para os autossomos evitando danos no caso de perdas de partes dos cromossomos sexuais.

- O estudo dos cromossomos sexuais de algumas espécies das famílias Muscidae, Calliphoridae e Sarcophagidae forneceu resultados interessantes que sugerem que na evolução dos cromossomos sexuais dos diferentes grupos tenham ocorrido perdas independentes destes cromossomos, e não uma origem comum a todos elas. Parece haver uma relação entre cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos e a localização da NOR nos autossomos. Observou-se que nas espécies onde os cromossomos sexuais não são totalmente heterocromáticos, a NOR está localizada nestes cromossomos.

As espécies da família Muscidae aparentemente estão num processo mais adiantado na evolução dos cromossomos sexuais. Existe uma grande variação de tamanho entre os cromossomos sexuais de diferentes espécies, sendo encontrados desde cromossomos muito grandes até pequenos pontos, sugerindo que partes destes cromossomos foram se fundindo com os autossomos ou sendo perdidas. Além disto, estes são heterocromáticos em todas as espécies estudadas e a NOR está localizada nos autossomos.

Pattonella intermutans possui grandes cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos e a NOR também está localizada nos autossomos. Já as espécies de Calliphoridae por nós estudadas, parecem estar em um processo intermediário, onde os cromossomos sexuais ainda não apresentam-se totalmente heterocromáticos e as NORs estão localizadas nestes cromossomos e não nos autossomos.

5. REFERÊNCIAS

- ALBERTO, J. (1989). The role of sex chromosomes. In: Wachtel S.S., ed. *Evolutionary mechanisms in sex determination*. Boca Raton, Florida p. 1-8.
- BAKER, R. H.; SAKAI, R. K. and MIAN, A. (1971). Linkage group chromosome correlation in *Culex tritaeniorhynchus*. **Science** **171**: 585-587.
- BEDO, D. G. (1977). Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes skuse*. I. Sibling speciation. **Chromosoma** **64**: 37-65.
- BEDO, D. G. (1991). Cytological characterization of heterochromatin in mitotic and meiotic chromosomes of the Old World screw worm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). **Genome**, **34**: 631-637.
- BEERMAN, W. (1955). Geschlechtsbestimmung und Evolution der genetischen Y-Chromosomen bei Chironomus. **Biol. Zeentralbl.** **74**:525-544.
- BENGTSSON, B. O. (1985). Biased conversion as the primary function of recombination. **Genet. Res.** **47**: 77-80.
- BERNSTEIN, H. (1977). Germ line recombination may be primarily a manifestation of DNA repair processes. **J. Theoretical Biol.** **69**: 371-380.
- BIANCHI, M. S.; BIANCHI, N. O.; PANTELIS, G. E. & WOLFF, S. (1985). The mechanisms and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. **Chromosoma** **91**: 131-136.
- BICUDO, H. E. M. C. (1981). Nucleolar organizer activity and its regulatory mechanisms in *Drosophila* species of the *mulleri* complex and their hybrids. **Caryologia** **34** 231-253.
- BOYES, J. W. (1967). The cytology of Muscoid flies. In: Wright J. W. & Pal R., ed. *Genetics of Insect Vectors of disease*. W.H.O. Elsevier Publ. Co. Amsterdam-London-New York, p.371-384.
- BOYES, J. W.; COREY, M. J. & PATERSON, H. E. (1964). Somatic Chromosomes of Higher Diptera. IX. Karyotypes of some Muscid species. **Can. J. Zool.** **42**: 1025-1036.
- BOYES, J. W. & VAN BRINK, J. M. (1965). Chromosomes of Calyptrate Diptera. **Can. J. Genet. Cytol.** **7**: 537-550.

- BULL, J. J. (1983). Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin-Cummings Publishing Company, California, p. 297.
- BULL, J. J. & CHARNOV, E. L. (1977). Changes in the heterogametic mechanism of sex determination. **Heredity** **39** (1): 1-14.
- BURISCH, E. (1963). Beiträge zur Genetik von *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae). **Z. Indukt Abst.** **94**: 322-330.
- CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G. E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E. J.; SIMONSSON, E.; WAGH, V. & ZECH, L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Exptl. Cell Res.** **49**: 219-222.
- CHARLESWORTH, B. (1978). Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **75**: 5618-5622.
- CHARLESWORTH, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. **Science** **251**: 1030-1033.
- CHRISTIDIS, L. (1986). Chromosomal evolution within the family Eastrididae. II. The Lonchurae. **Genetica** **71**: 99-113.
- DARLINGTON, C. D. (1958). Evolution of genetic systems, 2nd ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- DAVIES, E. G. & SOUTHERN, D. I. (1976). Giemsa C-banding within the genus *Glossina* (Diptera, Glossinidae). **Genetica** **46**: 413-418.
- DENHOLM, I., FRANCO, M. G., RUBINI, P. G. & VECCHI, M. (1983). Identification of a male determinant on the X chromosome of housefly (*Musca domestica* L.) populations in South-East England. **Genet. Res.** **42**: 311-322.
- DENHOLM, I., FRANCO, M. G., RUBINI, P. G. & VECCHI, M. (1985). Geographical variation in housefly (*Musca domestica* L.) sex determinants within the British Isles. **Genet. Res.** **47**: 19-27.
- DENNHÖFER, L. (1972) Die Zuordnung der Koppelungsgruppen zuden Chromosomen bei der Stechmücke *Culex pipiens* L. **Chromosoma** **37**: 43-52.
- ENDOW, S. A. & GALL, J. G. (1975). Differential replication of satellite DNA in polyploid tissue of *Drosophila virilis*. **Chromosoma** **50**: 175-195.

- ETTINGER, L. (1986). Meiosis: a selection stage preserving the genome's pattern of organization. **Evol. Theory** 8: 17-26.
- EL AGOSE, M.; LEMEUNIER, F. & PERIQUET, G. (1992). Mitotic and salivary gland chromosome analyses in the *Musca domestica* L. (house fly) (Diptera: Muscidae). **Heredity** 69: 57-64.
- FRANCO, I., RUBINI, P. G. & VECCHI, M. (1982). Sex determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica* L. of Western Europe. **Genet. Res.** 40: 279-293.
- FERADAY, R. M.; LEONHARDT, K. G. & BROCKHOUSE, L. C. (1989). The role of sex chromosomes in black fly evolution. **Genome** 32: 538-542.
- FRANCO, I., RUBINI, P. G. & VECCHI, M. (1982). Sex determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica* L. of Western Europe. **Genet. Res.** 40: 279-293.
- GOSALVEZ, J.; BELLA, J. L.; LÓPEZ-FERNANDEZ, C. & MEZZANOTTE, R. (1987). Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). **Heredity** 59: 173-180.
- GREEN, M. M. (1980). Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. **Ann. Rev. Genet.** 14: 109-120.
- GRIFFITHS, G. C. D. (1972). The Phylogenetic Classification of Diptera Cyclorrhapha with special reference to the structure of the male postabdomen. Schimitschek, E. G., ed. The Hague, Belinfante, p. 340.
- HAAF, T. & SCHMID, M. (1984). An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). **Chromosoma** 89: 37-41.
- HÄGELE, K. (1985). Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*. **Chromosoma** 91: 167-171.
- HÄGELE, K. & RANGANATTI, H. A. (1983). The chromosomes of two *Drosophila* races: *Drosophila nasuta nasuta* and *D. n. albomicans*. III. Localization of nucleolar organizer regions. **Genetica** 60: 123-128.

- HEDIGER, M.; MINET, A. D.; NIESSEN, M.; SCHMIDT, R.; HIFIKER-KLEINER, D.; ÇAKIR, S.; NÖTHIGER, R. & DÜBENDORFER, A. (1998). The male determining activity on the Y chromosome of the housefly (*Musca domestica* L.) consist of separable elements. **Genetics** **150**: 651-661.
- HEITZ, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. I. **Jabet. Wiss. Bot.** **69**: 762-818.
- HENDERSON, S. A. and PARSONS, T. (1963). The chromosomes of eleven species of Tipulid. **Caryologia** **16**: 337-346.
- HENNIG, W. (1986). Heterochromatin and germ line-restrict DNA. In: Hennig, W. ed. *Results and Problems in Cell Differentiation. Germ Line-Soma Differentiation*. Springer-Verlag. Berlin, p. 175-192.
- HENNIG, W.; LINK, B. & LEONCINI, O. (1975). The location of nucleolus organizer regions in *Drosophila hydei*. **Chromosoma** **51**: 57-63.
- HIROYOSHI, T. (1964). Sex-limited inheritance and abnormal sex ration in strains of the housefly. **Genetics** **50**: 373-385.
- HIROYOSHI, T. & FUKUMORI, Y. (1978). On the sex-determination in wild populations of the housefly. **Jap. J. Genet.** **53**: 420-421.
- HIROYOSHI, T. & INOUE, H. (1979). On the IM -chromosome of the housefly. **Jpn. J. Genet.** **54**: 434.
- HOLLIDAY, R. (1984). The biological significance of meiosis. In: Evans, C.W. & Dickinson, H.G., ed. *Controlling Events in Meiosis*. The Company of Biologists Ltd, Cambridge. p.381-394.
- IMAI, H. T.; HIRAI, H.; SATTA, Y.; SHIROISHI, T.; YAMADA, M. & TAYLOR, R. W. (1992). Phase specific Ag-staining of nucleolar organizer regions (NORs) and kinetochores in the Australian ant *Myrmecia croslandi*. **Jpn J. Genet.** **76**: 437-447.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R.W. & CROZIER, R.H. (1994). Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants if the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmecinae). **Jpn. J. Gent.** **69**: 137-182.

- ITURRA, P. & VELOSO, A. (1989). Further evidence for early sex chromosome differentiation of Anuran species. **Genetica** **78**: 25-31.
- JABLONKA, E. & LAMB, M. J. (1990). The evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Biol. Rev.** **65**: 249-276.
- JOHN, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S., ed. *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1-147.
- KAUL, D.; CHATURVEDI, R.; GAUR, P. & TEWARI, R. R. (1978). Cytogenetics of the genus *Parasarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). **Chromosoma** **68**: 73-82.
- KERR, R. W. (1961). Inheritance of DDT resistance involving the Y-chromosome in the housefly (*Musca domestica* L.). **Austr. J. of Biol. Sci.** **14**: 605-619.
- KERR, R. W. (1970). Inheritance of DDT resistance in a laboratory colony of house fly, *Musca domestica* L. **Aust. J. Biol. Sci.** **23**: 377-400.
- KING, M. (1980). C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217.
- KING, M. & JOHN, B. (1980). Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma** **76**: 123-150.
- KNIBIEHLER, B.; MIRRE, C. & ROSSET, R. (1982). Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus without fibrillar centers: The nucleolus an established *Drosophila* cell line. **J. Cell Sci.** **57**: 351-364.
- KRAEMER, C. & SCHMIDT, E. (1993). The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. **Chromosoma** **102**: 553-562.
- KUMAR, A. & RAI, K. S. (1990). Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). **Hereditas** **113**: 277-289.

- LIMA DE FARIA, A.; ISAKSSON, M. & OLSSON, E. (1980). Action of restriction endonucleases on the DNA and chromosomes of *Muntiacus muntjak*. **Hereditas** 92: 267-273.
- MACDONALD, P. T. & RAI, K. S. (1970). Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito *Aedes aegypti* L. **Genetics** 66: 475-485.
- MAINX, F. (1959). Die Geschlechtsverhältnisse der Phoride *Megaselia scalaris* und das Problem einer alternativen Geschlechtsbestimmung. **Z. Vererbungslehre** 90: 251-256.
- MAINX, F. (1962). Ein neuer Modus der genotypischen Geschlechtsbestimmung. **Biol. Zentr.** 81: 335-340.
- MAINX, F. (1964). The genetics of *Megaselia scalaris* Loew (phoridae): a new type of sex determining in Diptera. **Am. Nat.** 98: 415-430.
- MAINX, F. (1966). Die Geschlechtsbestimmung bei *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae). **Z. Verebungl** 98: 49-60.
- MARCHI A. & MEZZANOTTE, R. (1988). Restriction endonucleases digestion and chromosome banding in the mosquito *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). **Heredity** 60: 21-26.
- MARCHI, A. & MEZZANOTTE, R. (1990). Inter-and intraspecific heterochromatin variation detected by restriction endonuclease digestion in two sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex. **Heredity** 65: 135-142.
- MARKS, G. E. & SCHWEIZER, D. (1974). Giemsa banding: Karyotype differences in some species of *Anemone* and in *Hepatica nobilis*. **Chromosoma** 44: 405-416.
- MARTIN, J. (1977). A possible genetic mechanism of aging, rejuvenation, and recombination in germinal cells. In: Sparkes, R.S., ed. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. 7, Molecular Human Cytogenetics. D. E. Comings and C. F. Fox. Academic Press, New York. p. 355-373.
- MARTIN, J. (1981). Location of a sex determining region in *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera: Chironomidae) using irradiation-induced chromosomal rearrangements. **Genetica** 57: 113-117.

- MARTIN, J. & LEE, B. T. (1980). Problems in speciation of *Chironomus oppositus* in south eastern Australia. In: Atchley, W.R. & Woodruff, D.S., ed. *Essays on evolution and speciation* in Honor of M. J. D. White., ed. Cambridge University Press, London. p. 75-97.
- MARTIN, J. & LEE, B. T. (1984). O. A phylogenetic study of sex determiner location in a group of Australasian *Chironomus* species (Diptera, Chironomidae). **Chromosoma** **90**: 190-197.
- MARTIN, J.; KUVANGKADILOK, C.; PEART, D. H. & LEE, B. T. O. (1980). Multiple sex determining regions in a group of related *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae). **Heredity** **44**: 367-382.
- MEZZANOTTE, R. (1986). The selective digestion of polytene and mitotic chromosomes of *Drosophila melanogaster* by the *AluI* and *HaeIII* restriction endonucleases. **Chromosoma** **93**: 249-255.
- MEZZANOTTE, R.; FERRUCCI, L; VANNI, R. & SUMNER, T. A. (1985). Some factors affecting action of restriction endonucleases on human metaphase chromosomes. **Exp. Cell Res.** **161**: 247-253.
- MILANI, R. (1975). The House fly, *Musca domestica*. In: King, R.C., ed. *Handbook of genetics, Vol. 3 - Invertebrates of genetic interest*, Plenum Press, New York, p. 377-399.
- MILANI, R., RUBINI, P. G. & FRANCO, M. G. (1967). Sex determination in the housefly. **Genet. Agraria** **21**: 385-411.
- MILLER, D. A.; GOSTEN, J. R.; HASTIE, N. D. & EVANS, H. J. (1984). Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. **Exptl. Cell Res.** **155**: 294-298.
- MULLER, H. J. (1914). A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. **J. Exptl. Zool.** **17**: 325-336.
- MULLER, H. J. (1918). Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. **Genetics** **3**: 422-499.
- MULLER, H. J. (1932). Further studies on the nature and causes of gene mutations. **Proc. 6th Int. Congr. Genet.**, ed. D. F. Jones, 1: 213-255.

- NARDI, I; RAGGHianti, M. & MANCINO, G. (1973). Banding patterns in new chromosomes by the Giemsa stain. **Chromosoma** 40: 321-331.
- OHNO, S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer-Verlag, Berlin. p. 192
- PARDUE, M. L. & GALL, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, 168: 1356-1358.
- PARISE, P. P. (1994). Estudo citogenético de duas espécies de dípteros de interesse médico-veterinário: *Haematobia irritans* e *Muscina stabulans* (Diptera, Muscidae). **Tese de mestrado**. UNICAMP. Campinas, p. 93.
- PARISE, P. P.; AVANCINI, R. M. P. & RECCO-PIMENTEL, S. M. (1996). Karyotypic characterization of *Muscina stabulans* (Fallen) (Diptera: Muscidae) using conventional staining, silver staining and C-banding. **Caryologia** 49 (1): 13-20.
- PATHAK, S.; HSU T. C. & ARRIGHI, F. E. (1973). Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). IV. The role of heterochromatin in Karyotype evolution. **Cytogenet. Cell Genet.** 12: 315-326.
- PHILLIPS, A. M.; BULL, A. & KELLY, L. E. (1994). Identification of a *Drosophila* gene encoding a Calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. **Neuron** 8: 631-642.
- QUMSIYEH, M. B. & BAKER, R. J. (1988). Comparative Cytogenetics and the determination of primitive karyotypes. **Cytogen. Cell Genet.** 47: 100-103.
- RICE, W. R. (1987). The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes **Evolution** 41: 911-914.
- ROTHFELS, K. H. (1956). Black flies: siblings, sex, and species grouping. **J. Hered.** 42: 113-122.
- ROTHFELS, K. H. & NAMBIAR, R. (1981). A cytological study of natural hybrids between *Prosimulium multidentatum* and *P. magnum* with notes on sex determination in the Simuliidae (Diptera). **Chromosoma** 82: 673-691.

- RUBINI, P. G. & FRANCO, M. G. (1972). Localization of the male determining factor, M, present in strain of *Musca domestica* L. **Genet. Agraria** **26**: 217-232.
- SCHEMPP, W. & SCHMID, M. (1981). Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma** **83**: 697-710.
- SCHMIDT, E. R.; KEYL, H-G. & HANKELN, T. (1988). *In situ* localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus*. **Chromosoma** **96**: 353-359.
- SHARMA, A. K. & SHARMA, A. (1983). Chromosomes in evolution of eukaryotic groups Vol. 1.
- SHONO, T. & SCOTT, J. G. (1990). Autosomal Sex-associated Pyrethroid resistance in a strain of House Fly (Diptera: Muscidae) with a Male-determining factor on chromosome three. **Entom. Soc. Am.** **83**(3): 686-689.
- SIEVERT, V.; KUHN, S. & TRAUT, W. (1997). Expression of the sex determining cascade genes Sex-lethal and *doublesex* in the phorid fly *Megaselia scalaris*. **Genome** **40**: 211-214.
- SPEAR, B. (1974) The genes for ribosomal RNA in diploid and polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma** **48**: 159-179.
- STEINEMANN, M. (1982). Multiple sex chromosomes in *Drosophila miranda*: a system to study the degeneration of a chromosome. **Chromosoma** **86**: 59-76.
- STEINEMANN, M. & STEINEMANN, S. (1992). Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retroposons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 7591-7595.
- SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **75**: 304-306.
- SUMNER, A. T. (1990). **Chromosome banding**. Unwin Hyman Ltda, London. p. 434.
- SUMNER, A. T. (1994). Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.** **38**: 91-109.

- SUMNER, A. T.; EVANS, H. J. & BUCKLAND, R. A. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biol.** **232**: 31-32.
- TOMITA, T & WADA, Y. (1989). Multifactorial sex determining in natural populations of the housefly (*Musca domestica* L.) in Japan. **Jpn. J. Genet.** **64**: 373-382.
- TRAUT, W. (1994). Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. **Genetics** **136**: 1097-1104.
- TRAUT, W. & WILLHOEFT, U. (1990). A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. **Chromosoma** **99**: 407-412.
- TROIANO, G. (1988). Heterozygous heterochromatin in Giemsa C-banded chromosomes of *Clogmia albipunctata* (*Telmatoscopus albipunctatus*) (Diptera: Psychodidae). **Caryologia** **41**: 201-208.
- ÜLLERICH, F. H. (1963). Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmung bei einigen Callphorinen (Calliphoridae, Diptera). **Cromosoma** **14**: 45-110.
- WAGONER, D. E. (1965). The linkage group-karyotype relationship in the house fly (*Musca domestica* L.). **Genetics** **52**: 482-483.
- WAGONER, D. E. (1969). Presence of male determining factors found on three autosomes in the housefly, *Musca domestica* L. **Nature** **233**: 187-188.
- WALLACE, A. & NEWTON, M. E. (1987). Heterochromatin diversity and cyclic responses to selective silver staining *Aedes aegypti* (L.). **Chromosoma** **95**: 89-93.
- WHITE, M. J. D. (1973). Animal cytology and Evolution. Cambridge University Press, p.961.
- WHITE, M. J. D.; DENNIS, E. S.; HONEYCUTT, R. L. & CONTRERAS, N. (1982). Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. IX. The ribosomal RNA cistrons. **Chromosoma** **85**: 181-199.
- WHITING, J. H. Jr; FARMER, J. L. & JEFFREY, D. E. (1987). Improved *in situ* hybridization and detection of biotin-labelled *D. melanogaster* DNA probes hybridized to *D. virilis* salivary gland chromosomes. **Dros. Info. Serv.** **66**: 170-171.

- WHITING, J. H. Jr, PLILEY, M. D., FARMER, J. L. & JEFFREY, D. E (1989). *In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. **Genetics** **122**: 99-109.
- WILLHOEFT, U. (1997). Fluorescence *in situ* hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse flies (Diptera: Glossinidae: Glossina). **Chrom. Res.** **5**: 262-267.
- WILLHOEFT, U. & FRANZ, G. (1996). Identification of the Sex-determining regions of the *Ceratitidis capitata* Y chromosome by deletion mapping. **Genetics** **144**: 739-745.
- WILLHOEFT, U. & TRAUT, W. (1990). Molecular differentiation of the homomorphic sex chromosomes in *Megaselia scalaris* (Diptera) detected by random DNA probes. **Chromosoma** **99**: 237-242.
- ZUMPT, F. (1975). Myiasis in man and animals in the Old World. London, Butterworths, p. 267.