

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

**A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO  
DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE  
*Drosophila simulans* E SUA DESCOBERTA EM  
*Drosophila melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Camila Gomes Steiner**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**2009**

**Mestre**

**STEINER, CAMILA GOMES**

**PPG-BA/UFSM, RS**

**A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO DE  
TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE *Drosophila simulans*  
E SUA DESCOBERTA EM *Drosophila melanogaster***

por

**Camila Gomes Steiner**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Biologia Evolutiva  
de Insetos – Evolução de Elementos Transponíveis, da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para  
obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. Elgion Lucio da Silva Loreto**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

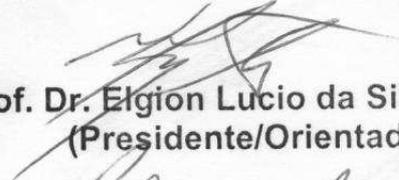
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO DE  
TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE *Drosophila simulans* E SUA  
DESCOBERTA EM *Drosophila melanogaster***

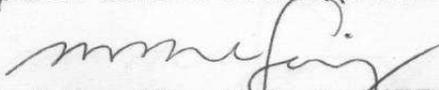
elaborada por  
**Camila Gomes Steiner**

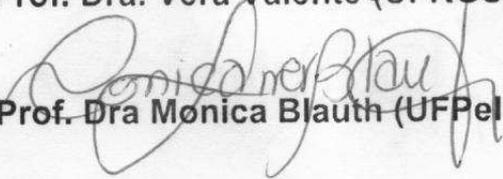
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal**

**Comissão Examinadora:**

  
Prof. Dr. Elgion Lucio da Silva Loreto  
(Presidente/Orientador)

  
Prof. Dr. Fabiano Torres (UNIPAMPA)

  
Prof. Dra. Vera Valente (UFRGS)

  
Prof. Dra. Monica Blauth (UFPEL)

Santa Maria, 9 de outubro de 2009.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus maiores mestres. Não há palavras que consigam expressar a imensa gratidão que sinto por vocês. Vocês são meu orgulho e modelo. Obrigada pelo amor, dedicação, carinho, educação, colo, respeito e amizade. Amo vocês!

Ao meu irmão pelas visitas que não enchiam apenas meu apartamento, mas também meu coração. Te admiro muito. Te amo!

Ao meu marido pela espera, apoio incondicional, companheirismo, força e compreensão durante minha ausência. Só tu para ir ao laboratório às seis da manhã e me ajudar a lavar os vidros das minhas moscas! É muito amor! Também te amo muito.

À minha melhor obra, meu filho. Meu maior incentivador. Agradeço todos os dias tua existência e peço desculpas pelos momentos que não pude estar contigo. Te amo Matheus.

Aos queridos Gelsa, Elcio, Marcus e Iracema agradeço todo o carinho e cuidado ofertados a mim e a meu filho nessa jornada.

Ao meu orientador Prof Elgion Loreto pelos ensinamentos, confiança e compreensão.

Ao Prof Sandro Santos e à Profa Lenira Sepel pelo apoio e altruísmo.

Aos meus colegas da pós, pelo convívio, contribuição e companheirismo. Em especial à Damaris Neri, mais um presente que recebi em razão do mestrado, obrigada por sua verdadeira amizade e à Joele Baumart que me fez lembrar que ainda existem pessoas boas e justas.

À amiga, colega e 'prima' Andreza que sempre me ajudou, sem hesitar, nos momentos mais inacreditáveis que passei enquanto morei em Santa Maria. Muito obrigada querida!

Ao povo do LabDros! Ronaldo, Lizandra, Paloma, Marcela, Ana Paula, Bruna, Luis Felipe, Francis, Karina, Brenda, Ana Lucia, Lucieli, Mauro e Ten Caten que tornaram a convivência no laboratório além de prazerosa, divertida. Em especial, agradeço muitíssimo ao Gabriel que sempre esteve disposto a tirar minhas dúvidas, a acompanhar meus ensaios e a suportar minha sombra no seu encaixo.

Este trabalho foi realizado com os recursos da CAPES, CNPq e FAPERGS.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE *Drosophila simulans* E SUA DESCOBERTA EM *Drosophila melanogaster***

AUTORA: CAMILA GOMES STEINER  
ORIENTADOR: PROF. DR. ELGION LUCIO DA SILVA LORETO  
DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA, 09 DE OUTUBRO DE 2009.

Os elementos transponíveis são seqüências de DNA capazes de alterar sua localização dentro do genoma e podem ser encontrados em praticamente todos os organismos.

O elemento transponível *mariner* pertence à classe II, superfamília *Tc1-mariner*. Uma inserção inativa deste elemento no gene *white* ( $w^+$ ) localizado no cromossomo X de *Drosophila simulans*, causa uma alteração fenotípica na cor dos olhos tornando-os cor de pêssego no lugar da coloração selvagem, sendo por este motivo denominada *white-peach* ( $w^{pch}$ ). Do cruzamento de fêmeas mutantes com machos coletados na natureza, uma prole com olhos cor de pêssego ou variegados com pontos de coloração selvagem é formada, possibilitando estimar a atividade transposicional em populações naturais.

A partir do uso deste sistema, diversos estudos têm sido realizados para compreender se o número de cópias e a atividade do elemento *mariner* estão envolvidos com fatores ambientais, históricos e/ou populacionais.

Neste trabalho, a existência de variabilidade intrapopulacional de *D. simulans* coletadas em dois pontos da cidade de Santa Maria – RS foi investigada através de cruzamentos com uma linhagem de *D. simulans*  $w^{pch}$ . Além disso, dados sobre uma outra espécie, *D. melanogaster*, também foram obtidos e analisados: cruzamentos interespecíficos que geraram descendência com variação fez com que o uso de ferramentas de pesquisa molecular, como PCR, clonagem e seqüenciamento, também fossem necessárias.

Os resultados obtidos sugerem a existência de variabilidade intrapopulacional em *D. simulans* e indicam a descoberta de seqüências semelhantes ao elemento *mariner* no genoma de populações naturais de *D. melanogaster*.

Palavras-chave: elemento transponível; *mariner*; variabilidade intrapopulacional; *Drosophila simulans*; *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **THE POPULATION VARIABILITY OF *mariner* TRANSPOSABLE ELEMENT IN THE SPECIES *Drosophila simulans* AND ITS DISCOVERY IN *Drosophila melanogaster***

AUTORA: CAMILA GOMES STEINER  
ORIENTADOR: PROF. DR. ELGION LUCIO DA SILVA LORETO  
DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA, 09 DE OUTUBRO DE 2009.

Transposable elements are DNA sequences that can change their location within the genome and can be found in almost all organisms.

The *mariner* transposable element belongs to Class II, *Tc1-mariner* superfamily. An inactive insertion of this element in the gene white ( $w^+$ ) located on the X chromosome, causes a phenotypic change in color's eyes becoming them a peach color in the place of the wild coloration, being for this reason called white-peach ( $w^{pch}$ ). Crossing of mutant females with males obtained from nature, an offspring with eyes the color of peach or variegated with spots of wild color is formed enabling estimate transposicional activity in natural populations.

From the use of this system, several studies have been performed to understand if the number of copies and the activity of the mariner element are involved with environmental factors, historical and/or populational.

In this study, the existence of intrapopulation variability of *D. simulans* collected in two places at Santa Maria (RS) city was investigated by crossing with a line of *D. simulans*  $w^{pch}$ . Moreover, data on another species, *D. melanogaster*, were also obtained and analyzed: interspecific crosses generated progeny with variegation. The isolines that showed these properties were studied using of molecular research tools, such as PCR, cloning and sequencing, it was also necessary.

The results suggest the existence of intrapopulation variability in *D. simulans* and indicate the discovery of sequences very similar to the element *mariner* in the genome of natural populations of *D. melanogaster*.

Key-words: transposable element; *mariner*; intrapopulation variability; *Drosophila simulans*; *Drosophila melanogaster*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>1.1. Elementos de Transposição</b> .....	12
<b>1.2. Transposons</b> .....	14
<b>1.3. O elemento <i>mariner</i></b> .....	15
<b>1.4. As espécies <i>Drosophila simulans</i> e <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	17
<b>1.5. <i>D. simulans</i>, <i>D. melanogaster</i> e o elemento <i>mariner</i></b> .....	19
<b>1.6. Justificativa e objetivos</b> .....	20
<b>2. CAPÍTULO 1:</b> .....	21
<b>2.1. Abstract</b> .....	21
<b>2.2. Resumo</b> .....	22
<b>2.3. Introdução</b> .....	23
<b>2.4. Materiais e métodos</b> .....	25
2.4.1. Populações naturais e pontos de coleta.....	25
2.4.2. Fêmeas <i>white-peach</i> utilizadas.....	26
2.4.3. Manutenção dos estoques de <i>Drosophila</i> .....	27
2.4.4. Cruzamentos.....	28
2.4.5. Extração do DNA.....	28
2.4.6. Reação em cadeia da polimerase.....	28
2.4.7. Clonagem e Seqüenciamento.....	29
<b>2.5. Resultados</b> .....	30
2.5.1. <i>Drosophila simulans</i> .....	31
2.5.2. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	31
<b>2.6. Discussão</b> .....	39
2.6.1. A variabilidade intrapopulacional do elemento <i>mariner</i> de <i>D. simulans</i> .....	39
2.6.2. A presença do elemento <i>mariner</i> na espécie <i>D. melanogaster</i> .....	40

<b>2.7. Perspectivas.....</b>	<b>41</b>
<b>2.8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>42</b>
<b>3. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Elementos de transposição

Os elementos transponíveis (TEs - *transposable elements*) foram descobertos em 1940, por Barbara McClintock e podem ser encontrados no genoma de todos os organismos já investigados. Estes elementos são seqüências de DNA que possuem a capacidade de mudar sua localização dentro do genoma hospedeiro, geralmente independente de homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam. Sua transposição pode causar duplicação nos sítios de inserção, polimorfismos e variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (CAPY *et al.*, 1998). Também é conhecida sua natureza parasítica, visto que, ao não encontrar restrições a sua invasão, realiza sua duplicação através das estruturas reprodutivas próprias da célula hospedeira (CRAIG, 2002; KIDWELL & LISCH, 2001).

Numerosas famílias de TEs têm sido descobertas e caracterizadas em todas as espécies examinadas (KIDWELL & LISCH, 2001). Cada família pode ser representada por poucas ou até milhares de cópias em um genoma. Com base em análises de bioinformática no genoma de *Drosophila melanogaster* foram identificados mais de 130 famílias diferentes de TEs (KAPITONOV & JURKA, 2003), com número de cópias variando entre uma e 146 (KAMINKER *et al.*, 2002).

Em 1989, Finnegan propôs o primeiro sistema de classificação destes elementos, dividindo-os em duas principais classes de acordo com sua estrutura e modo de transposição. Neste sistema, ficou estipulado que os elementos da classe I são aqueles que se transpõem por replicação envolvendo um intermediário de RNA que sofre transcrição reversa para a inserção, os retrotransposons. Eles possuem um mecanismo de transposição habitualmente chamado de "copia-e-cola".

Elementos da classe II usam DNA como intermediário direto da transposição, utilizam um mecanismo denominado "recorta-e-cola" e são chamados transposons. Uma classificação mais detalhada considera a estrutura geral dos elementos, existência de domínios, motivos e assinaturas protéicas semelhantes e o grau de similaridade de seqüências de DNA ou aminoácido para definir subclasses, superfamílias, famílias e subfamílias (CAPY *et al.*, 1997).

Ainda conforme o sistema descrito por Finnegan (1989), elementos de classe I e II compreendem elementos autônomos e não-autônomos. Somente os elementos autônomos possuem todas as seqüências que codificam as proteínas essenciais para sua propagação. No entanto, elementos não-autônomos são mobilizados pelas atividades enzimáticas providas por elementos autônomos (KIDWELL & LISCH, 2001).

Para Wicker *et al* (2007), a descoberta de TEs bacterianos e eucarióticos que copiam e colam sem um intermediário de RNA, chamados de miniaturas de elementos transponíveis com repetições invertidas (MITEs), tem alterado este método composto por duas classes.

Atualmente, um novo sistema de chave, desenvolvido pelos autores acima mencionados, é proposto para classificar os TEs. A partir deste, o elemento recebe uma sigla composta por três letras que correspondem, respectivamente, a classe, ordem e superfamília; e ainda acompanham o nome da família (ou subfamília), a seqüência na qual o elemento foi encontrado (a partir do registro no banco de dados) e um número que define a inserção individual do registro. Este sistema reconcilia ambas abordagens, mantendo duas classes de TEs enquanto usa critérios mecanicista e enzimático. Ele utiliza (em ordem hierárquica) os níveis de classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília.

Neste novo modelo de classificação, o nível mais alto (classe) divide TEs pela presença ou ausência de um RNA de transposição intermediário, como antes. Na classe I, que utiliza um intermediário de RNA, a subclasse, que era previamente utilizada para separar os elementos de repetição terminal longa (LTR) dos sem LTR [elementos nucleares dispersos longos e curtos (LINE e SINE)], agora é única e subdivide-se em cinco ordens: LTR retrotransposons, *DIRS*-like elements, *Penelope*-like elements (PLEs), LINEs e SINEs. A classe II, que não utiliza intermediário de RNA, contém duas subclasses: uma distingue elementos que deixam o sítio doador para reintegrar em outros locais (mecanismo "recorta-e-cola") e a outra se autocopia para inserir (mecanismo "copia-e-cola") chamadas, respectivamente, de subclasse I e II. A subclasse I segrega-se em elementos de repetição terminal invertida (TIR) e Crypton; a subclasse II decompõe-se em *Helitron* e *Maverick*.

As superfamílias compartilham da estratégia de replicação, mas são distinguíveis, por exemplo, através da estrutura protéica ou domínios não codificantes e ainda na presença e no tamanho do sítio alvo de duplicação (TSD).

Elas subdividem-se em famílias que são definidas através da similaridade de seqüências na sua região codificadora (se presente) ou no domínio interno, ou na sua região terminal repetitiva.

Conforme estes autores, embora os TEs permaneçam classificados em relativamente poucas ordens e superfamílias, um grande genoma único pode conter centenas ou milhares de famílias diversas.

Os TEs são componentes numerosos dos genomas, podendo constituir mais da metade do genoma em algumas plantas (SANMIGUEL *et al.*, 1996). A abundância e a ubiquidade dessas seqüências origina uma série de questões sobre a natureza das relações entre TEs e seus hospedeiros, bem como sobre as implicações desses elementos na evolução dos genomas (KIDWELL & LISCH, 2001). Um acúmulo crescente de evidências moleculares têm sugerido várias maneiras pelas quais os TEs podem afetar a evolução dos organismos nos quais eles residem (MCDONALD, 1993; KIDWELL & LISCH, 2001; BECKER & LÖNNIG, 2001).

## 1.2. Transposons

Os TEs classe II são antigos, encontrados em quase todos eucariotos e também em procariotos nas formas simples chamadas seqüências de inserção (IS) ou como parte de estruturas mais complexas. Subdivide-se em:

Subclasse I: compreende TEs do sistema "recorta-e-cola" da ordem TIR, caracterizada por sua repetição terminal invertida de comprimento variável. As nove superfamílias conhecidas são distinguidas por seqüências TIR e tamanho do TSD (WICKER *et al.*, 2007). A transposição é mediada por uma enzima transposase que reconhece as TIRs e corta ambas fitas em cada extremidade (CAPY *et al.*, 1998). Os TEs *Crypton* que são pouco conhecidos e têm sido encontrados somente em fungos, são a segunda ordem desta subclasse. Eles provavelmente realizam a transposição via DNA intermediário e necessitam clivar ambas as fitas de DNA durante este processo, o que justifica sua inclusão neste grupo.

Subclasse II: contêm TEs que sofrem um processo de transposição que implica em replicação sem clivagem da dupla fita. Estes TEs tipo "copia-e-cola" realizam sua transposição com o deslocamento de somente uma fita. É composta de

duas ordens: a *Helitron* (parecendo replicar via mecanismo "rolling-circle", com somente uma fita cortada e sem gerar TSDs) e a *Maverick* (excisão de uma fita simples seguida por replicação extracromossomal e integração a um novo local) (WICKER *et al*, 2007).

### 1.3. O elemento *mariner*

A família de elementos transponíveis *mariner* pode ser classificada como pertencente à classe II, subclasse I, ordem TIR, superfamília *Tc1-mariner* (WICKER *et al*, 2007). Foi inicialmente descoberto no genoma de *D. mauritiana* em função de uma mutação no gene *white* ( $w^+$ ) localizado no cromossomo X, causadora de uma alteração fenotípica na cor dos olhos (JACOBSON & HARTL, 1985; HAYMER & MARSH, 1986). Esta mutação resulta da inserção de um elemento inativo de *mariner* (denominado elemento *peach*) na região promotora do gene  $w^+$  gerando indivíduos com olhos cor de pêssego no lugar da coloração selvagem normal, sendo por este motivo denominada *white-peach* ( $w^{pch}$ ) (JACOBSON, MEDHORA & HARTL, 1986). Possui um comprimento total de aproximadamente 1200 pares de bases (pb), com TIRs de 28 pb e apresentam uma única ORF ("open reading frame") capaz de codificar uma transposase de aproximadamente 350 aminoácidos (CAPY *et al*, 1992).

*mariner* possui a incomum capacidade de ser instável tanto em células somáticas quanto em células germinativas, o que acaba o aproximando às características de transposons de plantas mais do que com transposons de *Drosophila* (JACOBSON & HARTL, 1985; HAYMER & MARSH, 1986). Essa instabilidade pode promover a excisão somática do elemento inserido no alelo  $w^{pch}$  sendo observada fenotipicamente como olhos coloridos em mosaico (isto é, *spots* ou pontos de coloração selvagem em um contexto *peach*).

Em caso de excisão germinal os olhos das moscas da progênie apresentarão fenótipo totalmente selvagem (HARTL, 1989). Contudo, o elemento de transposição presente no gene *white* produz uma transposase não-funcional, sendo incapaz de realizar sua própria mobilização (não-autônomo). Para que ocorra a transposição, é necessária uma fonte extrínseca de transposase funcional (JACOBSON, MEDHORA & HARTL, 1986; BRYAN, GARZA & HARTL, 1990; GARZA *et al.*, 1991; LOHE &

HARTL, 1996;). Dessa forma, ensaios empregando o elemento *mariner peach* têm permitido uma ampla utilização deste sistema para a análise quanto à presença e nível de expressão de transposons *mariner* ativos e autônomos em determinados genomas.

Conforme ilustrado na Figura 1, através do sistema *white-peach*, aspectos da atividade de *mariner* podem ser investigados em populações naturais de *D. simulans* de acordo com a quantidade de indivíduos machos que apresentam o fenótipo de olho mosaico (Porcentagem de Machos Mosaicos ou PMM) (CAPY *et al.*, 1990; RUSSEL & WOODRUFF, 1999).

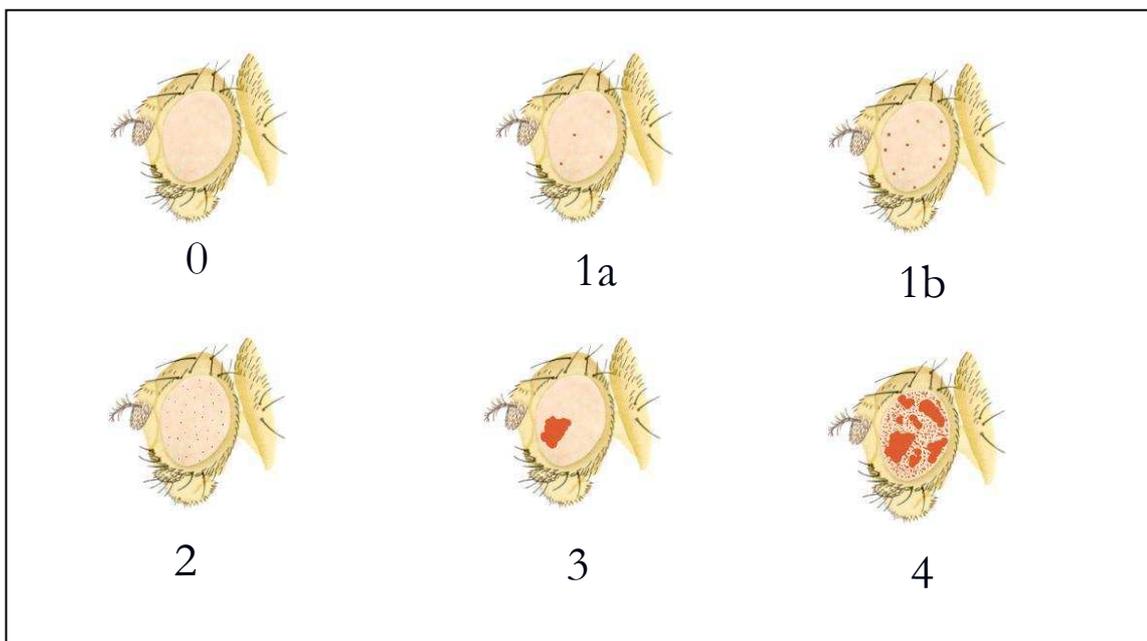


Figura 01 – Classificação para machos mosaico. 0 - *white-peach* sem mosaico; 1a e 1b – mosaico *white-peach* categoria 1 (*mariner* com baixa atividade); 2 – mosaico *white-peach* categoria 2; 3 - mosaico *white-peach* categoria 3; 4 - mosaico *white-peach* categoria 4 (*mariner* com alta atividade) – Modificado de CAPY *et al.*, 1990.

Desde que uma linhagem dessa espécie contendo o sistema foi produzida por cruzamento interespecífico seguido por alguns retrocruzamentos com uma linhagem  $w^{pch}$  de *D. mauritiana*, diversos estudos (CAPY *et al.*, 1990; CAPY *et al.*, 1992; PICOT, *et al.*, 2008; RUSSEL & WOODRUFF, 1999; GIRAUD & CAPY, 1996) têm sido realizados para compreender se o número de cópias e a atividade transposicional estão envolvidos com fatores ambientais, históricos e/ou populacionais.

Pesquisas recentes exploram a possibilidade do nível de atividade de *mariner* estar relacionado à recente colonização mundial da *D. simulans*, onde a

variabilidade da atividade somática do elemento encontra-se relacionada à principal rota de saída da África ou a rota do Nilo (onde foi registrada uma baixa atividade) e a recente colonização dos continentes como a Austrália e América do Sul (alta atividade) (PICOT *et al*, 2008).

#### 1.4. As espécies *Drosophila simulans* e *Drosophila melanogaster*

Estas duas espécies cosmopolitas são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas. Por possuírem um ancestral comum, do qual divergiram a aproximadamente 2 milhões de anos atrás, apresentam numerosos atributos comuns, mas também diferenças significativas. Ao longo do tempo, já foram pesquisadas diversas características destas espécies, incluindo: inversões cromossômicas, DNA mitocondrial, polimorfismo enzimático, além de caracteres morfológicos, fisiológicos, comportamentais, entre outros (CAPY *et al*, 1993). São utilizadas em diversos campos de pesquisa como na ecologia, biogeografia, morfologia, fisiologia, desenvolvimento, genética de populações, genética molecular e evolução (CAPY & GIBERT, 2004).

A espécie *Drosophila simulans* foi descrita em 1919 por Alfred Henry Sturtevant. Ele também atribuiu características favoráveis à manutenção da espécie em laboratório, que também podem ser aplicadas à *D. melanogaster*, como: geração curta, desenvolvimento em torno de 25°C, pequeno espaço, possibilidade de testar simultaneamente grande número de indivíduos, estocagem de grandes populações naturais e a existência de grandes coleções destas populações disponíveis em vários centros de estoque e/ ou diretamente nos laboratórios (CAPY & GIBERT, 2004).

A espécie *Drosophila melanogaster* foi descrita primeiramente por Johann Wihelm Meigen em 1830 e é um dos organismos mais intensamente estudados na biologia, servindo como um sistema modelo para a investigação de muitos processos celulares e de desenvolvimento comuns aos eucariotos superiores, incluindo humanos (ADAMS *et al*, 2000).

As duas espécies são cosmopolitas, freqüentemente encontradas em qualquer área geográfica, em diferentes latitudes e altitudes (CAPY & GIBERT, 2004). Possuem intensa similaridade na história demográfica e na faixa de

distribuição (DAVID & CAPY, 1988; IRVIN *et al.*, 1998; CAPY & GIBERT, 2004; LACHAISE & SILVAIN, 2004). Em muitos casos são simpátricas. Contudo, esta paridade na distribuição encobre uma profunda divergência no seu comportamento micro-espacial. Por exemplo, tem sido observado que *D. simulans* raramente entra em habitações, enquanto *D. melanogaster* freqüentemente o faz (ROUAULT & DAVID, 1982; DAVID & TSACAS, 1983).

Ambas são nativas da África tropical, mas também são aptas à proliferação sob clima temperado e subtropical (DAVID *et al.*, 2004). Como a existência de diferenças na adaptabilidade à temperatura auxilia a compreensão da abundância e distribuição destas duas espécies, exemplares europeus foram submetidos a um teste comparativo. Durante o experimento, exibiram um decréscimo linear em temperaturas baixas, com uma mortalidade completa a 10°C. Em temperaturas altas, uma diferença significativa foi observada entre elas, onde *D. melanogaster* foi ligeiramente mais transigente ao calor do que a espécie irmã. Mais precisamente, é possível manter *D. melanogaster* a 31°C, enquanto *D. simulans* exibe uma baixíssima viabilidade nesta temperatura. Além disso, também foi possível verificar que *D. simulans* é mais tolerante, ou melhor adaptada ao frio que *D. melanogaster* (PÉTAVY *et al.*, 2001).

Trabalhos realizados nas décadas de 60, 70 e 80 sugeriram que particularidades fisiológicas e morfométricas são menos diversificadas em *D. simulans* quando comparada a sua espécie irmã (CAPY & GIBERT, 2004).

A variabilidade genética pode ser avaliada em dois níveis: dentro e entre as populações. *Drosophila melanogaster* é mais variável que *D. simulans* entre as populações da mesma espécie, mas as duas mostram níveis similares de variabilidade genética dentro das populações (CAPY & GIBERT, 2004).

A proporção de TEs no genoma de *D. simulans* é mais baixa do que em *D. melanogaster* – 2,73% contra 5,35% (CLARK *et al.*, 2007) - e isso se deve, provavelmente, as altas taxas de transposição destes elementos nesta espécie (BIÉMONT *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2002). Apesar disto, *D. simulans* tem uma variabilidade genética do DNA nuclear maior que a de *D. melanogaster*, ao passo que o contrário ocorre nos níveis enzimáticos e morfológicos, sendo crucial (CAPY & GIBERT, 2004).

Quando comparadas em relação à transferência horizontal - que é a habilidade de um elemento transponível invadir novos genomas -, a diferença da

freqüência observada entre essas duas espécies pode existir devido a uma antiga dispersão mundial de *D. melanogaster* da África tropical, comparada a *D. simulans* (CAPY *et al*, 1993). Além de caracterizar-se por um nicho mais restritivo (SINGH, R.S.; CHOUDHARY, M. & DAVID, J.R., 1987) é possível inferir que *D. simulans* teve poucas oportunidades de experiências de transferências horizontais devido a uma invasão mundial recente (VIEIRA *et al*, 1999).

Segundo o que discutiram David & Capy (1988) e Lachaise *et al.* (1988), a colonização mundial desta espécie ocorreu há poucos séculos, contrastando com *D. melanogaster* que primeiro colonizou o continente Eurasiano após a última Era Glacial (10000-15000 anos atrás), mais tarde irradiando-se pelos continentes Australiano e Americano, provavelmente junto com o tráfico de escravos. Lachaise *et al* (1988) e Picot *et al* (2008) propuseram que a Rota do Nilo foi seguida.

Para Capy & Gibert (2004), apesar de não terem colonizado sua presente área de distribuição durante o mesmo período, o potencial de colonização e a habilidade adaptativa das duas espécies pode ser similar.

### **1.5. *D. simulans*, *D. melanogaster* e o elemento *mariner***

Desde o início da década passada, pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de compreender se a variação no nível de atividade do elemento transponível *mariner* em populações naturais de *D. simulans* coletadas em diversos pontos do globo, tem sido influenciada por fatores ambientais, históricos e/ou populacionais.

Capy *et al.* (1990) verificaram que todas as populações naturais desta espécie contêm elementos *mariner* ativos e que existe uma variabilidade quanto à presença destes elementos entre populações recém coletadas da natureza.

Isolinhagens obtidas de diferentes populações indicam que o número de cópias por genoma nesta espécie pode variar de zero a dezesseis (LORETO *et al*, 1998) e o número de cópias na população é passível de modificação ao longo do tempo (CHAKRANI *et al*, 1993).

Essa diferença no número de cópias do elemento tem despertado interesse em diversos autores que buscam compreender o que está relacionado ao nível de atividade do elemento.

Em 1993, Chakrani *et al* observaram que o nível de atividade do elemento aumenta com a manutenção das linhagens de *D. simulans* em temperaturas mais altas no laboratório.

Giraud e Capy (1996) apontaram uma correlação positiva do nível de atividade com as coordenadas latitudinais em que a linhagem de *D. simulans* foi coletada. Populações oriundas de áreas quentes possuíam atividade menor do que as de áreas mais frias quando testadas em condições padrões no laboratório.

Inversamente, Russel e Woodruff (1999) encontraram uma ligeira correlação negativa com as coordenadas latitudinais de diversos pontos espalhados pelo mundo, mas uma correlação altamente significativa, na forma de clina, em linhagens australianas. Neste trabalho também foi possível observar uma perda da atividade à medida que as linhagens foram sendo mantidas em temperatura constante no laboratório.

Em trabalhos mais recentes Picot *et al* (2008), ao analisarem diversas populações de *D. simulans* ao redor do mundo, inclusive as utilizadas nas pesquisas previamente citadas, concluíram que o nível de atividade do elemento pode ser usado como um possível marcador de invasão, já que a atividade é maior onde o tamanho populacional é menor. Migrantes de *D. simulans*, diante de um novo ambiente estressante, gerariam uma instabilidade genômica que desregulariam a atividade do elemento *mariner* fazendo com que novas combinações genéticas fossem selecionadas. Um acúmulo de TEs (e também um provável aumento de sua atividade), poderia ser o resultado de um drástico decréscimo populacional devido ao processo de invasão, fazendo com que o efeito da deriva genética seja excedido. Além disso, também puderam observar que características deste elemento podem variar conforme a latitude e longitude e não conforme as variáveis climáticas.

Em relação ao comportamento do elemento *mariner* no genoma de *D. melanogaster*, não é possível examina-lo, já que pesquisas realizadas até o momento indicam ausência deste elemento transponível em populações naturais desta espécie (JACOBSON, MEDHORA & HARTL, 1986; HARTL, 1989; MURYAMA & HARTL, 1991; GARZA *et al*, 1991; CAPY *et al*, 1992; LINDHOLM, LOHE & HARTL, 1993).

## **1.6. Justificativa e objetivos**

Vários trabalhos têm apontado polimorfismos no número de cópias e atividade transposicional do elemento *mariner* entre as populações de *D. simulans* coletadas em pontos das mais diversas partes do mundo. Entretanto, raros estudos têm focado a variabilidade intrapopulacional relacionada a este caractere. Deste modo, uma pesquisa realizada dentro de uma mesma população torna-se necessária, fornecendo um incremento nos dados já obtidos em relação ao comportamento do elemento transponível *mariner* em populações naturais de *D. simulans*.

Além disto, a ausência do elemento *mariner* em populações européias naturais de *D. melanogaster* aparece citada em diversos trabalhos, porém estudos em relação a este elemento transponível em populações não-européias de *D. melanogaster* são inexistentes.

Picot *et al* (2008) descrevem que o nível de atividade do elemento transponível *mariner* na espécie *D. simulans* pode ser usado como um marcador de invasão, sendo mais ativo nas regiões recentemente colonizadas. Esta alta atividade pode estar relacionada ao estresse ambiental que origina uma instabilidade genômica e desregula a atividade. Portanto, uma investigação da presença deste elemento em populações de *D. melanogaster*, considerada espécie-irmã de *D. simulans* (CAPY & GIBERT, 2004), oriundas de regiões recentemente colonizadas, torna-se importante.

Os objetivos do presente trabalho foram:

- analisar a atividade transposicional em duas diferentes populações naturais de *D. simulans*.
- caracterizar o elemento transponível *mariner* em uma população natural de *D. melanogaster*.

## **2. CAPÍTULO 1: A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE *Drosophila simulans* E SUA DESCOBERTA EM *Drosophila melanogaster***

### **2.1 Abstract**

**THE POPULATION VARIABILITY OF *mariner* TRANSPOSABLE ELEMENT IN THE SPECIES *Drosophila simulans* AND ITS DISCOVERY IN *Drosophila melanogaster***

Transposable elements are DNA sequences that can change their location within the genome and can be found in almost all organisms.

The *mariner* transposable element belongs to Class II, *Tc1-mariner* superfamily. An inactive insertion of this element in the gene white ( $w^+$ ) located on the X chromosome, causes a phenotypic change in eye color making the color of “peach” instead of the wild coloration, and is therefore called white-peach ( $w^{pch}$ ). Crossing of mutant females with males drawn from nature, an offspring with eyes the color of peach or variegated with spots of wild color is formed enabling estimate transpositional activity in natural populations.

From the use of this system, several studies have been performed to understand if the number of copies and the activity of the *mariner* element are involved with environmental factors, historical and/or populational.

In this study, the existence of intrapopulation variability of *D. simulans* collected in two places at Santa Maria (RS) city was investigated by crossing with a line of *D. simulans*  $w^{pch}$ . Moreover, data on another species, *D. melanogaster*, were also obtained and analyzed: interspecific crosses generated progeny with variegation. The isolines that showed these properties were studied using of molecular research tools, such as PCR, cloning and sequencing, it was also necessary.

The results suggest the existence of intrapopulation variability in *D. simulans* and indicate the discovery of sequences very similar to the element *mariner* in the genome of natural populations of *D. melanogaster*.

Key-words: transposable element; *mariner*; intrapopulation variability; *Drosophila simulans*; *Drosophila melanogaster*

## 2.2 Resumo

**A VARIABILIDADE POPULACIONAL DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* NA ESPÉCIE *Drosophila simulans* E SUA DESCOBERTA EM *Drosophila melanogaster***

Os elementos transponíveis são seqüências de DNA capazes de alterar sua localização dentro do genoma e podem ser encontrados em praticamente todos os organismos.

O elemento transponível *mariner* pertence à classe II, superfamília *Tc1-mariner*. Uma inserção inativa deste elemento no gene *white* ( $w^+$ ) localizado no cromossomo X de *Drosophila simulans*, causa uma alteração fenotípica na cor dos olhos tornando-os cor de pêssego no lugar da coloração selvagem, sendo por este motivo denominada *white-peach* ( $w^{pch}$ ). Do cruzamento de fêmeas mutantes com machos coletados na natureza, uma prole com olhos cor de pêssego ou variegados com pontos de coloração selvagem é formada, possibilitando estimar a atividade transposicional em populações naturais.

A partir do uso deste sistema, diversos estudos têm sido realizados para compreender se o número de cópias e a atividade do elemento *mariner* estão envolvidos com fatores ambientais, históricos e/ou populacionais.

Neste trabalho, a existência de variabilidade intrapopulacional de *D. simulans* coletadas em dois pontos da cidade de Santa Maria – RS foi investigada através de cruzamentos com uma linhagem de *D. simulans*  $w^{pch}$ . Além disso, dados sobre uma outra espécie, *D. melanogaster*, também foram obtidos e analisados: cruzamentos interespecíficos que geraram descendência com variação fez com que o uso de ferramentas de pesquisa molecular, como PCR, clonagem e seqüenciamento, também fossem necessárias.

Os resultados obtidos sugerem a existência de variabilidade intrapopulacional em *D. simulans* e indicam a descoberta de seqüências semelhantes ao elemento *mariner* no genoma de populações naturais de *D. melanogaster*.

Palavras-chave: elemento transponível, *mariner*, variabilidade intrapopulacional, *Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster*.

## 2.3 Introdução

Os elementos transponíveis (TEs - *transposable elements*) foram descobertos em 1940, por Barbara McClintock e podem ser encontrados no genoma dos organismos já investigados. São seqüências de DNA com capacidade de mudar sua

localização no genoma hospedeiro, podendo causar duplicação nos sítios de inserção, polimorfismos e variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies.

*mariner* é um TE Classe II e pertence a superfamília *Tc1/mariner*. Possui um comprimento total de aproximadamente 1200 pares de bases (pb), com TIRs de 28 pb e apresentam uma única ORF ("open reading frame") capaz de codificar uma transposase de aproximadamente 350 aminoácidos (CAPY *et al*, 1992).

Este elemento transponível foi inicialmente descoberto em função de uma inserção de um elemento *mariner* inativo (denominado *peach*) no gene *white* ( $w^+$ ) no cromossomo X de *Drosophila mauritiana*, causadora de uma alteração fenotípica (JACOBSON & HARTL, 1985; HAYMER & MARSH, 1986), gerando indivíduos com olhos cor de pêssego no lugar da coloração selvagem, sendo por este motivo denominada *white-peach* ( $w^{pch}$ ) (JACOBSON, MEDHORA & HARTL, 1986).

Por meio de cruzamentos interespecíficos, uma linhagem de  $w^{pch}$  *D. mauritiana* foi produzida, possibilitando o surgimento de diversos estudos que visam compreender se fatores ambientais, históricos e/ou populacionais interferem no número de cópias e na atividade transposicional do elemento.

A partir do sistema *white-peach*, a atividade do elemento *mariner* pode também ser medida em populações naturais de *D. simulans* de acordo com a quantidade de indivíduos machos que apresentam olhos com fenótipo mosaico (Porcentagem de Machos Mosaicos ou PMM), isto é, com pontos de coloração selvagem em um contexto *peach* (CAPY *et al.*, 1990; RUSSEL & WOODRUFF, 1999).

Pesquisas recentes concluíram que o nível de atividade do elemento pode ser usado como um possível marcador de invasão, relacionado à recente colonização mundial da *D. simulans*, onde a variabilidade da atividade somática do elemento encontra-se relacionada à principal rota de saída da África (a rota do Nilo) e a recente colonização dos continentes como a Austrália e América do Sul (PICOT *et al*, 2008).

Até o presente momento, dentre as oito espécies compreendidas no subgrupo *melanogaster*, o elemento *mariner* está presente em populações naturais de *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba* e *D. teissieri*, mas ausente em *D. melanogaster*, *D. erecta* e *D. orena* (JACOBSON, MEDHORA & HARTL, 1986;

HARTL, 1989; MURYAMA & HARTL, 1991; GARZA *et al*, 1991; CAPY *et al*, 1992; LINDHOLM, LOHE & HARTL, 1993).

Vários trabalhos têm apontado polimorfismos no número de cópias e atividade transposicional do elemento *mariner* entre as populações de *D. simulans* coletadas em pontos das mais diversas partes do mundo. Entretanto, raros estudos têm focado a variabilidade intrapopulacional relacionada a este caractere. Deste modo, uma pesquisa realizada dentro de uma mesma população torna-se necessária, fornecendo um incremento nos dados já obtidos em relação ao comportamento do elemento transponível *mariner* em populações naturais de *D. simulans*.

Além disto, a ausência do elemento *mariner* em populações européias naturais de *D. melanogaster* aparece citada em diversos trabalhos, porém estudos em relação a este elemento transponível em populações não-européias de *D. melanogaster* são inexistentes.

Picot *et al* (2008) descrevem que o nível de atividade do elemento transponível *mariner* na espécie *D. simulans* pode ser usado como um marcador de invasão, sendo mais ativo nas regiões recentemente colonizadas. Esta alta atividade pode estar relacionada ao estresse ambiental que origina uma instabilidade genômica e desregula a atividade. Portanto, uma investigação da presença deste elemento em populações de *D. melanogaster*, considerada espécie-irmã de *D. simulans* (CAPY & GIBERT, 2004), oriundas de regiões recentemente colonizadas, torna-se importante.

Os principais objetivos deste trabalho foram investigar a existência de variabilidade intrapopulacional em relação ao elemento *mariner* de *D. simulans* coletadas em dois pontos distintos e analisar a presença do elemento *mariner* na espécie *D. melanogaster*.

## **2.4 Materiais e Métodos**

### **2.4.1. Populações naturais e pontos de coleta**

As isolinhagens foram obtidas a partir de indivíduos das espécies *D. simulans* e *D. melanogaster* coletados na localidade de São Marcos e de *D. simulans* do

Jardim Botânico da UFSM, ambos pertencentes ao município de Santa Maria - Rio Grande do Sul (Figura 02).

Estes pontos distam aproximadamente 4 km e apresentam as seguintes características:

São Marcos – as armadilhas para captura foram instaladas próximo a um depósito de material orgânico em uma residência. Esta localidade caracteriza-se por parca urbanização, onde os lotes residenciais são distantes entre si, há campos com cultivo de grãos e alguns adensamentos florestais que geralmente estão relacionados a um curso d'água. Latitude 29°41'S e longitude 53°42'O.

Jardim Botânico – localizado dentro da UFSM. As armadilhas foram instaladas em uma mata de pinus (*Pinus* sp.) que beira a estrada de acesso ao Jardim Botânico. Próximo ao local de coleta também é possível encontrar uma plantação de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.). Latitude 29°42'S e longitude 53°43'O.

Da localidade Jardim Botânico, nove fêmeas fertilizadas de *D. simulans* foram selecionadas ao acaso. Da localidade de São Marcos, cinco fêmeas fertilizadas de *D. simulans* e sete fêmeas fertilizadas de *D. melanogaster* foram escolhidas através da mesma metodologia. Os machos das isolinhagens derivadas de cada fêmea foram utilizados nos cruzamentos.

As armadilhas utilizadas nas coletas basearam-se no método descrito por Martins *et al* (2008).

#### 2.4.2 Fêmeas *white-peach* utilizadas

Tanto a linhagem  $w^{pch}$  de *D. simulans* (CAPY *et al*, 1990) quanto a  $w^{pch}$  de *D. melanogaster* (elemento introduzido em laboratório) foram gentilmente cedidas por Pierre Capy (CNRS – Paris, França).



Figura 02 – Foto de satélite dos pontos de coleta. Imagem obtida através do aplicativo Google Earth.

#### 2.4.3 Manutenção dos estoques de *Drosophila*

Os estoques de drosofilídeos foram mantidos a 22°C, em meio de cultura a base de farinha de milho, adaptado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Santa Maria. O meio foi preparado a partir de uma mistura constituída de 2 kg de farinha de milho, 280 g de germe de trigo, 1 xícara de açúcar, 3 colheres de sopa de leite em pó, 1 colher de sopa de sal. Para cada 9g desta mistura acrescentaremos 100 mL de água destilada, 0,5g de *Agar agar* em pó, 20g de banana e 0,26g de Nipagin dissolvido em etanol comercial. A mistura foi cozida por aproximadamente 10 minutos, distribuída nos vidros de cultura e esterilizada.

As moscas foram transferidas, semanalmente, para frascos com meios de cultura novos, que deram condições de alimentação e oviposição. O meio de cultura,

de onde as moscas foram retiradas, foi estocado em câmara de temperatura constante (22°C) onde as larvas eclodiram e se alimentaram. Quando adultas, foram novamente transferidas para frascos com meio de cultura novo.

#### 2.4.4 Cruzamentos

Dez machos de cada isolinhagem foram selecionados ao acaso e cruzados com dez fêmeas *white-peach* não fertilizadas, sendo realizadas três réplicas para cada cruzamento.

Os olhos dos machos da prole de cada isolinhagem foram analisados e classificados conforme a quantidade de pontos selvagens no contexto *peach*. Quando nenhum ponto fosse observado, era considerado pertencente à categoria 0, representando ausência da atividade do elemento *mariner*. A partir do aumento no número de pontos, os machos foram classificados nas categorias seguintes: 1a, 1b, 2, 3 e 4, esta última indicando o mosaicismo mais acentuado, ou seja, o número máximo de pontos selvagens e, portanto, representando uma alta atividade do elemento *mariner* (Figura 03).

A Taxa de Excisão Somática (TES) é calculada com base no número de machos que apresentaram mosaicismo dividido pelo número total de machos obtidos na prole.

Os cruzamentos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e meio de cultura descritos anteriormente.

#### 2.4.5. Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de moscas adultas de todas as isolinhagens obtidas nos pontos de coleta, utilizando protocolo segundo Oliveira *et al.* (2009).

#### 2.4.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença de distribuição e variabilidade do elemento *mariner* foi investigada a nível molecular por diferentes PCRs. Os fragmentos amplificados foram fracionados em um gel de agarose 0,6%.

Uma reação foi realizada com 50ng de DNA genômico em uma solução de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 *umols* de cada deoxinucleotídeo, 40 picomols de um *primer* específico para o elemento *mariner*, 1 unidade de *Taq* polimerase (Invitrogen®), e tampão da *Taq* polimerase 1x (Invitrogen®) em um volume total de 20  $\mu$ l. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos compostos de: 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C, e 1,5 minuto a 72°C, seguido de um período de extensão extra de 7 minutos a 72°C.

Os *primers* utilizados (5' AGTCCACATGTTTCATACTTTACAGC 3') anelam na região das TIRs e tem o objetivo de amplificar apenas cópias relacionadas ao elemento Mos-1 de *D. mauritiana*.

A outra reação foi constituída das mesmas condições acima, porém *primers* (*forward*: 5' ATGGGTGCCACATGAGTT 3' e *reverse*: 5' GGCCAGGTCTGGTGAGTA 3') que amplificam uma região interna do elemento foram utilizados, resultando num fragmento de 490 pb. Para amplificação foram necessários: 2 minutos a 97°C; 35 ciclos de: 30 segundos a 97°C, 30 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C e ainda um período extra de extensão de 5 minutos a 72°C.

Analisando os fragmentos gerados por PCR em gel de agarose podemos comparar a diversidade do tamanho das cópias em cada população com o grau de atividade da transposase.

Para controle, alguns fragmentos foram amplificados com *primers* específicos para o elemento *hobo*<sup>va</sup> de *D. simulans* conforme descrito por Torres *et al* (2006). Este método foi utilizado visando gerar fragmentos diagnósticos para o elemento *hobo* presente em *D. simulans*, que diferem claramente do observado em *D. melanogaster*.

#### 2.4.7. Clonagem e seqüenciamento

O produto da PCR foi purificado e clonado utilizando o plasmídeo pCR-TOPO® (Invitrogen).

O seqüenciamento de DNA foi realizado diretamente dos plasmídeos purificados em seqüenciador automático MegaBace 500 no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Santa Maria. A reação de terminação em cadeia foi feita com o kit Dyanamic ET® (Amersham) e com os *primers* já descritos. Ambas as fitas foram seqüenciadas.

Inicialmente, as seqüências de nucleotídeos obtidas foram confirmadas pelo uso do BLASTN (NCBI). As seqüências de cada clone foram submetidas separadamente a análise de consenso realizada com base na confiabilidade apresentada pelos cromatogramas obtidos, pelo uso do programa Gap 4 do Staden Package (Staden, 1996) e o alinhamento das seqüências foi gerado com a utilização do programa GeneDoc.

## 2.5. Resultados

Os olhos dos machos da progênie foram analisados e quantificados (PMM) de acordo com a quantidade de *spots* (Figura 03). As categorias são: 0 (zero), 1a, 1b, 2, 3 e 4 e são classificadas de acordo com nível de atividade do elemento. A categoria 0 representa ausência de atividade do elemento transponível *mariner*. As categorias 1a e 1b representam a menor atividade do elemento e a categoria 4 determina uma alta atividade de *mariner*.



Figura 03 – machos de *D. simulans*. A e B - categoria 4; C – categoria 3.

### 2.5.1 *Drosophila simulans*

A Tabela 01 exibe os resultados dos cruzamentos entre machos de *D. simulans* selvagens e fêmeas *D. simulans white-peach*. Do total de quatorze isolinhagens, cinco foram obtidas a partir de uma coleta na localidade de São Marcos e nove no Jardim Botânico.

Estes dados mostram que a Taxa de Excisão Somática (TES) é extremamente variável tanto dentro quanto entre os locais de coleta.

Na localidade de São Marcos, a TES variou de 23,53% a 61,36% e apenas a isolinhagem 17 apresentou indivíduos da categoria 4. Já na localidade Jardim Botânico, a TES variou de 5,56% a 83,64% e de todas as isolinhagens estudadas, apenas duas não apresentaram machos pertencentes à categoria 4.

Estas diferenças refletem-se diretamente na TES entre os pontos de coleta, totalizando a média de 35,71% da população de São Marcos contra a média de 54,6% da população do Jardim Botânico e demonstram a variabilidade intrapopulacional.

### 2.5.2 *Drosophila melanogaster*

A Tabela 02 exibe os cruzamentos efetuados com machos das isolinhagens de *D. melanogaster* com fêmeas de *D. simulans white-peach*. Nenhum dos cruzamentos gerou indivíduos pertencentes às categorias 1a, 2 e 4, esta última, a de maior atividade do elemento *mariner*. Apenas os cruzamentos das isolinhagens 7 e 13 originaram descendentes fêmeas, num total de seis e duas, respectivamente.

De um total de sete isolinhagens cruzadas, somente uma (Iso 26) não apresentou atividade do elemento transponível *mariner*, pois todos os machos que nasceram deste cruzamento pertenciam à categoria zero, ou seja, não apresentavam *spots* selvagens no contexto *peach*.

As demais (isolinhas 2, 7, 8, 10, 13 e 16) manifestaram o nível de atividade do elemento nas categorias 1a e/ou 3 e a média da TES de todas as isolinhagens foi de 18,27%.

Já que os cruzamentos entre as espécies *D. melanogaster* (selvagem) e *D. simulans white-peach* produziram descendência e variação, testes foram realizados com o objetivo de confirmar a classificação da espécie coletada.

Primeiramente, indivíduos de três das sete isolinhagens de *D. melanogaster* foram selecionados ao acaso e cruzados com espécimes de *D. melanogaster* da linhagem contendo a mutação *brown*. A Tabela 03 demonstra que os cruzamentos originaram uma prole significativa e que existe um equilíbrio no número de descendentes machos e fêmeas.

Em seguida, a Tabela 04 mostra que os cruzamentos entre as isolinhagens de *D. melanogaster* que apresentavam pouca ou nenhuma atividade do elemento (Iso 8, Iso 10 e Iso 26) foram cruzadas dentro de sua isolinhagem (para efeito de controle) e também com aquelas *D. simulans* que possuíam Taxa de Excisão Somática elevada (Iso 5 e Iso 25). A totalidade dos cruzamentos entre *D. simulans* e *D. melanogaster* não gerou prole. Excetuando o cruzamento controle da isolinhagem 26 (*D. melanogaster*), de São Marcos, os demais produziram descendentes.

Tabela 01 – Porcentagem de machos mosaico e valores das Taxas de Excisão Somática da F1 dos cruzamentos das isolinhagens de *D.simulans* obtidas a partir das amostras populacionais da localidade de São Marcos e Jardim Botânico com *D. simulans white-peach*.

	Cat. 0 (%)	Cat. 1a (%)	Cat. 1b (%)	Cat. 2 (%)	Cat. 3 (%)	Cat. 4 (%)	♂	TxExSm (%)	♀
São Marcos (♂ <i>D. simulans</i> cruzados ♀ <i>D.simulans w<sup>pch</sup></i> )									
<b>Iso 1</b>	75,00	12,50	0	0	12,50	0	40	25,00	58
<b>Iso 3</b>	38,63	36,36	9,09	0	15,90	0	44	61,36	60
<b>Iso 6</b>	69,23	28,21	0	0	2,56	0	39	30,77	135
<b>Iso 17</b>	62,06	20,69	0	0	10,34	6,89	29	37,93	46
<b>Iso 21</b>	76,47	11,76	0	0	11,76	0	34	23,53	71
<b>média</b>								35,71	
Jardim Botânico (♂ <i>D. simulans</i> cruzados ♀ <i>D. simulans w<sup>pch</sup></i> )									
<b>Iso 2</b>	28,57	52,38	0	0	14,28	4,76	21	71,43	32
<b>Iso 3</b>	51,72	13,79	10,34	1,72	10,34	12,06	58	48,28	95
<b>Iso 5</b>	16,36	52,72	0	3,63	25,45	1,81	55	83,64	76
<b>Iso 6</b>	51,61	35,48	0	0	6,45	6,45	31	48,39	38
<b>Iso 14</b>	46,66	53,33	0	0	0	0	15	53,33	31
<b>Iso 16</b>	70,17	3,50	7,01	0	14,03	5,26	57	29,83	75
<b>Iso 17</b>	94,44	5,55	0	0	0	0	18	5,56	36
<b>Iso 21</b>	31,57	15,78	10,52	0	31,57	10,52	19	68,42	46
<b>Iso 25</b>	17,39	8,69	8,69	0	43,47	21,73	23	82,61	49
<b>média</b>								54,6	

Tabela 02 – Porcentagem de machos mosaico e valores das Taxas de Excisão Somática da F1 dos cruzamentos das isolinhagens de *D. melanogaster* obtidas a partir das amostras populacionais da localidade de São Marcos com *D. simulans white-peach*.

	Cat. 0 (%)	Cat. 1a (%)	Cat. 1b (%)	Cat. 2 (%)	Cat. 3 (%)	Cat. 4 (%)	♂	TxExSm (%)	♀
São Marcos (♂ <i>D. melanogaster</i> cruzados ♀ <i>D. simulans w<sup>pch</sup></i> )									
<b>Iso 2</b>	70,58	29,41	0	0	0	0	17	29,41	0
<b>Iso 7</b>	77,14	31,43	0	0	8,57	0	35	40,00	6
<b>Iso 8</b>	90,00	10,00	0	0	0	0	30	10,00	0
<b>Iso 10</b>	90,62	0	0	0	9,37	0	32	9,38	0
<b>Iso 13</b>	74,19	20,97	0	0	4,83	0	62	25,81	2
<b>Iso 16</b>	86,66	0	0	0	13,33	0	15	13,33	0
<b>Iso 26</b>	100,00	0	0	0	0	0	19	0,00	0
<b>média</b>								18,27	

Tabela 03 – Cruzamento entre *D. melanogaster* linhagem *brown* e isolinhagens de *D. melanogaster* 7, 10 e 16 da localidade de São Marcos.

	Fêmeas	Machos	Total
<i>D. melanogaster-brown</i> x Iso 7	41	41	82
<i>D. melanogaster-brown</i> x Iso 10	38	46	84
<i>D. melanogaster-brown</i> x Iso 16	70	65	135

Tabela 04 – Cruzamentos entre isolinhagens de *D. simulans* obtidas no ponto de coleta Jardim Botânico (JB) e isolinhagens de *D. melanogaster* obtidas no ponto de coleta São Marcos (SM).

CRUZAMENTO (P)		F1	
Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Iso 8 SM	Iso 5 JB	0	0
Iso 8 SM	Iso 8 SM	4	4
Iso 8 SM	Iso 25 JB	0	0
Iso 10 SM	Iso 5 JB	0	0
Iso 10 SM	Iso 10 SM	16	11
Iso 10 SM	Iso 25 JB	0	0
Iso 26 SM	Iso 5 JB	0	0
Iso 26 SM	Iso 25 JB	0	0
Iso 26 SM	Iso 26 SM	0	0
Iso 5 JB	Iso 5 JB	41	22
Iso 5 JB	Iso 8 SM	0	0
Iso 5 JB	Iso 10 SM	0	0
Iso 5 JB	Iso 26 SM	0	0
Iso 25 JB	Iso 8 SM	0	0
Iso 25 JB	Iso 10 SM	0	0
Iso 25 JB	Iso 25 JB	4	3
Iso 25 JB	Iso 26 SM	0	0

Finalmente, um último teste foi realizado com o intuito de obter mais uma confirmação a respeito da espécie que estávamos trabalhando. Uma PCR para os elementos de transposição *hobo*<sup>va</sup> foi realizada. Torres *et al* (2006) descreveram diferenças relacionadas sobre este elemento nas duas espécies. Em *D. simulans* ele conta com aproximadamente 82% de similaridade com o elemento *hobo* na forma completa.

Na Figura 04 é possível verificar a diferença dos fragmentos obtidos através da PCR. Além de algumas isolinhagens selecionadas aleatoriamente de *D. melanogaster* da localidade de São Marcos (Iso 10, Iso 7 e Iso 2), foram usados como controle o DNA genômico de uma linhagem de *D. melanogaster*, o de *D. simulans*, os DNAs das isolinhagens 1 e 3 de *D. simulans* da localidade Jardim Botânico e ainda um plasmídeo com o *hobo*<sup>va</sup> inserido.

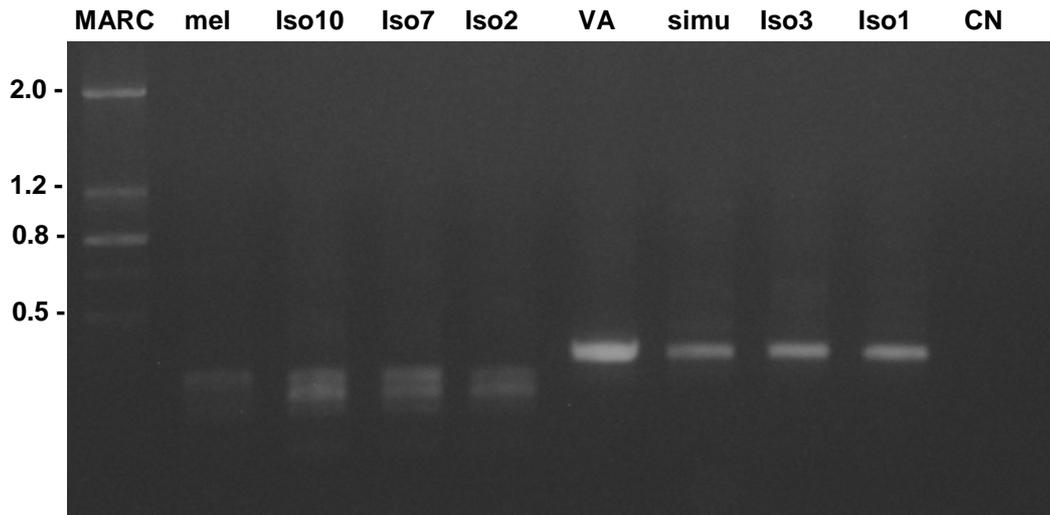


Figura 04 – PCR *hobo<sup>Va</sup>*. MARC: marcador de peso molecular; mel: *D. melanogaster*; Iso 10, Iso 7 e Iso 2: isolinhagens de *D. melanogaster* de São Marcos; VA: plasmídeo com *hobo<sup>Va</sup>*; simu: *D. simulans*; Iso 3 e Iso 1: isolinhagens de *D. simulans* do Jardim Botânico; CN: controle negativo (reação PCR + água). Gel de agarose 0,6% corado com EtBr.

A partir da confirmação que as isolinhagens da localidade de São Marcos eram da espécie *D. melanogaster*, deveríamos evidenciar que portavam o elemento *mariner*. Para isso, fizemos duas ampliações.

A primeira (Figura 05), utilizando *primers* que anelam nas TIRs, originou bandas fracas. O DNA genômico de *D. melanogaster* e de *D. simulans* também foi empregado como controle.

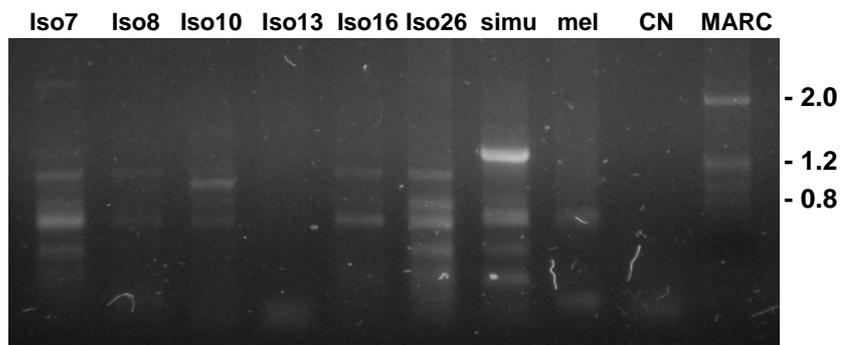


Figura 05 – PCR de isolinhagens da localidade de São Marcos. Isolinhagens: 7, 8, 10, 13, 16 e 26; simu: *D. simulans*; mel: *D. melanogaster*; CN: controle negativo (reação PCR + água). MARC: marcador de peso molecular; Gel de agarose 0,6% corado com EtBr.

Em seguida, o produto da PCR das isolinhagens foi clonado e a segunda amplificação, também com *primers peach*, produziu bandas bastante intensas (Figura 06).

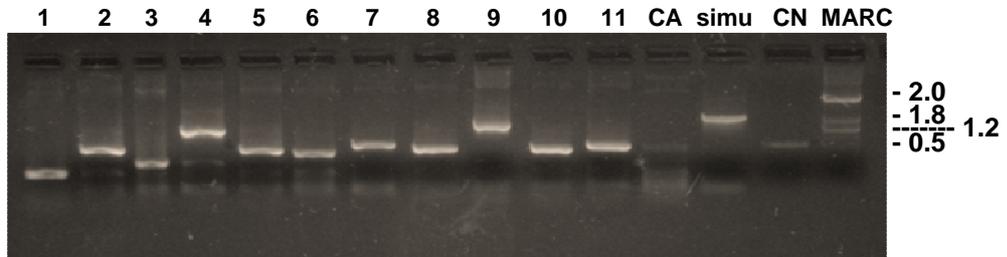


Figura 06 – PCR de 11 clones da isolinhagem 7 de São Marcos; CA: colônia azul (controle); sim: *D. simulans*; CN: controle negativo (reação PCR + água). MARC: marcador de peso molecular; Gel de agarose 0,6% corado com EtBr.

Um dos clones da isolinhagem 10, quando submetido ao seqüenciamento e em seguida a análise pelo BLASTN (NCBI), gerou a seqüência 87% semelhante ao elemento *mariner* de *D. mauritiana* e 85% ao de *D. simulans* (Figura 07).

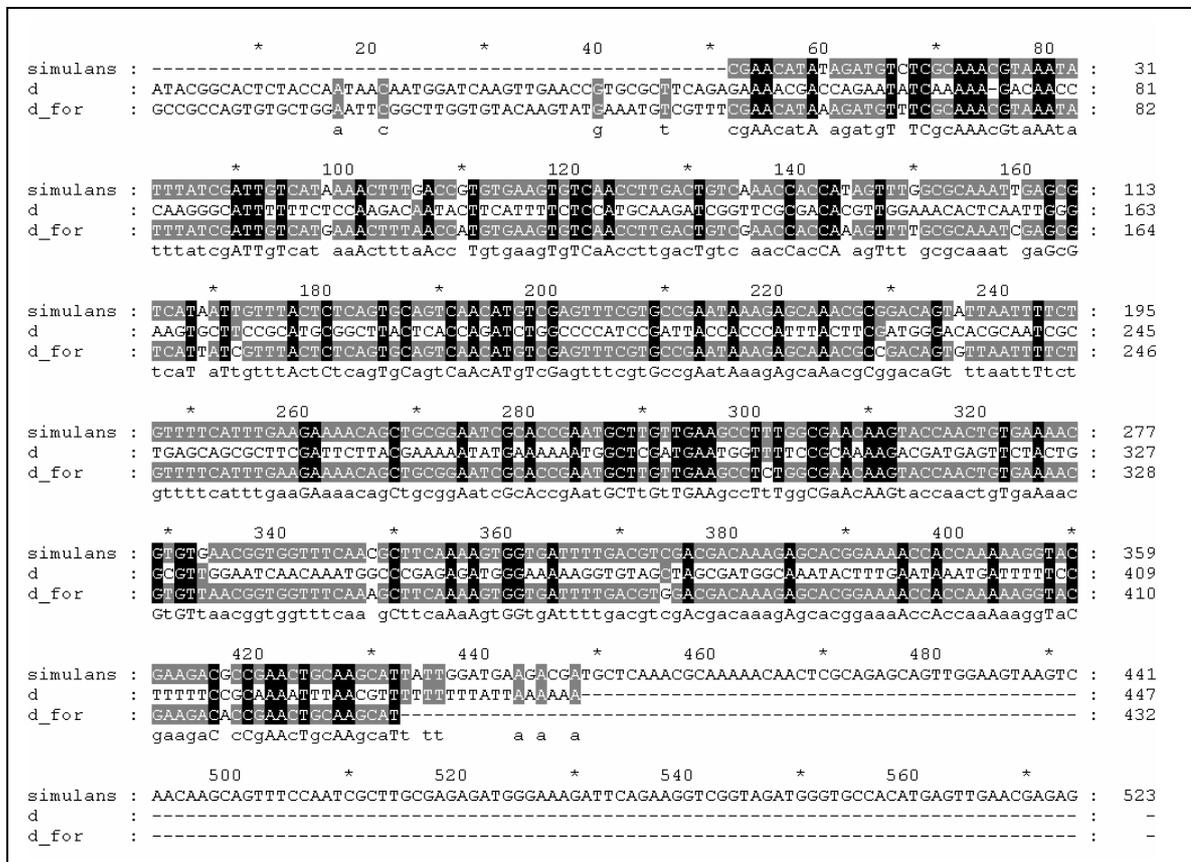


Figura 07 – Alinhamento das seqüências de um clone da isolinhagem 10 de *D. melanogaster* da localidade de São Marcos e do TE *mariner* de *D. simulans*.

Os fatores *Mos* (mosaico) são elementos *mariner* identificados por sua habilidade de induzir altos níveis de mosaicismo *white-peach* e foram originalmente identificados em *D. mauritiana*. O elemento *Mos1* tem 1286pb de tamanho, assim como o elemento *peach*. Diferem-se por 11 nucleotídeos, incluindo quatro aminoácidos substituídos ao longo da ORF (MEDHORA, M.; MARUYAMA, K. & HARTL, D.L., 1991). Uma clonagem e posterior amplificação deste fator e da seqüência estudada foram realizadas, mostrando que o fragmento de interesse (um clone da Iso 10, aqui denominado D) possui um tamanho menor que o fator *Mos1* (Figura 08).

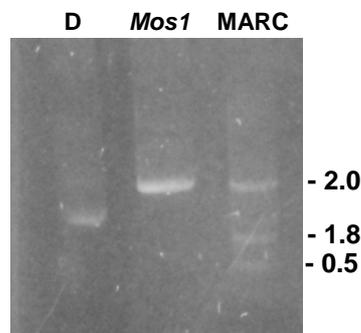


Figura 08 – PCR de clones (vetores) M13 com inserção da seqüência de *Mos1* e do D. MARC: marcador de peso molecular; Gel de agarose 0,6% corado com EtBr.

Amplificações com *primers* internos foram efetuadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção, possibilitando uma identificação mais precisa da seqüência alvo. Em seguida, o seqüenciamento revelou um fragmento idêntico aquele encontrado na parte interna do *mariner* em *D. simulans* (Figura 09).

Por fim, cruzamentos entre uma linhagem de *D. melanogaster white-peach* foram realizados em temperaturas diferentes – 20°C e 25°C –, porém nenhum descendente apresentou variação (Tabelas 05 e 06). Conforme Lemeunier *et al* (1986), fêmeas de *D. melanogaster* quando cruzadas com machos de *D. simulans* geram fêmeas estéreis e raros ou nenhum macho.

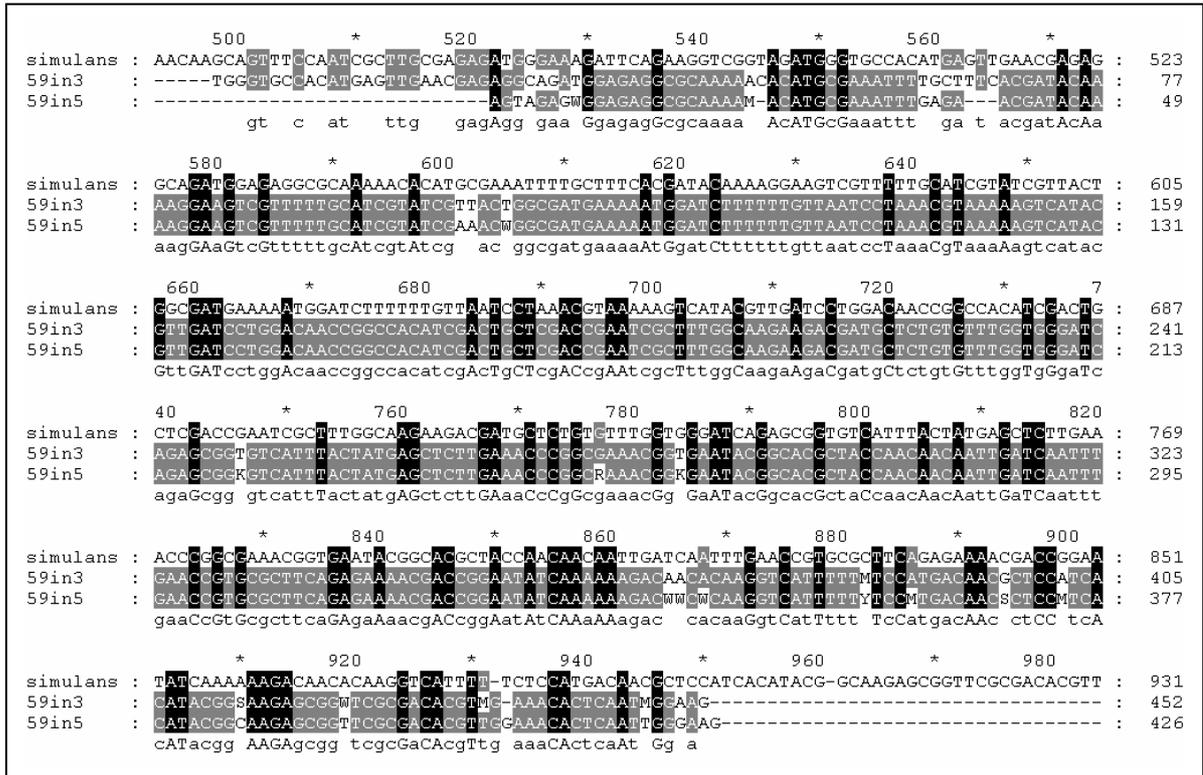


Figura 09 – Alinhamento das seqüências da isolinhagem 13 de *D. melanogaster* da localidade de São Marcos com o TE *mariner* de *D. simulans*.

Tabela 05 – Cruzamentos entre isolinhagens *D. melanogaster* e *D. simulans* (sim) da localidade de São Marcos com linhagem de *D. melanogaster white-peach* a 20°C.

Iso	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	Obs
	Cat.0	Cat. 1a	Cat. 1b	Cat. 2	Cat. 3	Cat. 4	Fêmeas	
7	125	0	0	0	0	0	129	
10	168	0	0	0	0	0	208	
13	0	0	0	0	0	0	0	*
16	135	0	0	0	0	0	175	
22	133	0	0	0	0	0	143	
sim	0	0	0	0	0	0	92	**

\* - muitos ovos, nenhuma larva;

\*\* - fêmeas melano x machos simulans = 0 machos e fêmeas estéreis. (LEMEUNIER *et al*, 1986)

Tabela 06 – Cruzamentos entre isolinhagens *D. melanogaster* e de *D. simulans* (sim) da localidade de São Marcos com linhagem de *D. melanogaster white-peach* a 25°C.

Iso	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	Obs
	Cat.0	Cat. 1a	Cat. 1b	Cat. 2	Cat. 3	Cat. 4	Fêmeas	
7	51	0	0	0	0	0	104	
10	21	0	0	0	0	0	39	
13	58	0	0	0	0	0	79	
16	84	0	0	0	0	0	129	
22	75	0	0	0	0	0	77	
sim	0	0	0	0	0	0	60	**

\* - fêmeas melano x machos simulans = 0 machos e fêmeas F1 estéreis (LEMEUNIER *et al*, 1986).

## 2.6 Discussão

### 2.6.1 A variabilidade intrapopulacional do elemento *mariner* de *D. simulans*

Estudos prévios realizados com populações coletadas em pontos das mais diversas partes do mundo fornecem inferências de caráter histórico (PICOT *et al*, 2008) suportando a hipótese de que a variabilidade interpopulacional exista devido à disseminação da espécie. Os resultados apresentam uma distribuição clinal, decorrente da análise de um perfil médio das populações pesquisadas. Entretanto, a inexistência de trabalhos relacionados às características intrapopulacionais dificulta o desenvolvimento de parâmetros em relação à pesquisa, como por exemplo, o número amostral.

Nossos resultados indicam a existência de variabilidade intrapopulacional das *D. simulans* coletadas. Esta variabilidade pode ocorrer devido às características ambientais dos pontos de coleta, que apresentam-se nitidamente distintas. Apesar de localizarem-se praticamente na mesma região geográfica, o ponto de coleta Jardim Botânico encontra-se numa região caracterizada por cultivo de pinheiros, eucaliptos e cana-de-açúcar, com parca matéria orgânica em decomposição, basicamente composta por folhas, enquanto o ponto de coleta São Marcos localiza-se junto a um depósito de matéria orgânica para decomposição, promovendo abrigo, alimento e local apropriado para oviposição de várias espécies de aracnídeos e insetos, principalmente drosofilídeos.

Estas diferenças influenciam não só a composição da comunidade animal encontrada em cada um dos pontos, como sua abundância, provocando maior ou menor interação entre e dentro das espécies, interferindo na variabilidade genética das populações coletadas.

A presente análise mostra-se pioneira quando avalia a variabilidade intrapopulacional e, como resultado, ainda indica diferenças entre os locais estudados, já que a média da TES comportou-se de forma diferenciada nas duas populações, sugerindo que populações diferentes de *D. simulans*, mesmo quando situados em regiões próximas, possuem variabilidade intrapopulacional significativa em relação atividade de *mariner*.

### 2.6.2 A presença do elemento *mariner* na espécie *D. melanogaster*

As isolinhagens de *D. melanogaster* testadas (2, 7, 8, 10, 13 e 16) apresentam o TE *mariner* inserido no seu genoma. Através dos testes realizados com *D. melanogaster white-peach*, é possível observar que estas cópias parecem não ser ativadas a partir desta metodologia, porém alguns autores têm argumentado que determinados transposons que não são ativos, tornam-se mobilizados a partir de cruzamentos interespecíficos (LABRADOR *et al*, 1999).

A fusão de dois genomas distintos origina extensas modificações no genoma e no transcriptoma, desencadeando alterações como: mobilização de elementos transponíveis, novos padrões de expressão gênica, novas variações fenotípicas, entre outras. Genomas diferentes combinados num zigoto híbrido, respondem às inúmeras mudanças regulatórias com um "choque genômico". Em plantas, a hibridização é comumente associada com uma subsequente duplicação genômica (alopoliploidia) (MICHALAK, P., 2009).

Apesar desta confirmação, é plausível inferir que *mariner* encontra-se no genoma desta população de *D. melanogaster* há algum tempo, uma vez que os fragmentos encontrados durante o estudo divergem do elemento na forma ativa, eles são menores que aquele encontrado originalmente em *D. simulans*.

A análise dos resultados gerou incertezas quanto à confirmação dos dois tipos diferentes de seqüências. Podemos estar trabalhando com uma seqüência mais conservada que amplifica com os *primers* internos e outra mais degenerada

que amplifica com os *primers* das TIRs ou uma seqüência única que possui as terminações degeneradas e a parte interna conservada.

Os elementos transponíveis, além das inúmeras características já citadas, também possuem a habilidade de invadir novos genomas. Este movimento de informações genéticas entre diferentes espécies é conhecido como transferência horizontal (*horizontal transfer* – HT) e tem sido proposto como essencial no 'ciclo de vida' dos transposons.

Em uma revisão recente, Loreto *et al* (2008) relatam exemplos como o elemento *P*, que apesar de fazer parte do genoma de *D. willistoni*, invadiu o da espécie *D. melanogaster*. E, para que este processo tenha êxito, além dos requisitos mínimos como sobreposições geográficas, temporais e ecológicas entre as espécies doadora e receptora, três tipos de evidências são observadas: i) TEs de espécies distantes porém com seqüências altamente similares, ii) incongruências entre as filogenias do hospedeiro e do TE e iii) e ocorrência descontínua do TE através da espécie. Além disso, diferentes mecanismos e vetores - como vírus, bactérias endossimbiontes e ácaros - que possibilitam o desenvolvimento deste processo foram descritos.

Em razão a estas colocações, sugerimos que a descoberta deste fragmento homólogo ao TE *mariner* de *D. simulans* na espécie *D. melanogaster* deve ser considerada como um exemplo de HT recente, uma vez que as condições para tal são atendidas.

## 2.7 Perspectivas

Em face de resultados surpreendentes apesar do número reduzido de linhagens analisadas, sugerimos a continuidade dos estudos. O fato de termos feito estes experimentos de PCR em dois diferentes laboratórios (Santa Maria e Paris - França) nos permite supor que são resultados consistentes, porém novos ensaios estão sendo realizados.

Em relação à variabilidade intrapopulacional de *D. simulans*, é preciso testar uma quantidade maior de populações, preferencialmente com o uso de ferramentas como o *Real Time* PCR (qPCR) para referendar esta questão através de meios moleculares.

Sobre o evento ocorrido em *D. melanogaster*, é imprescindível verificar o quanto difundida está a presença do elemento *mariner* no genoma desta espécie. Para que isto ocorra, um número maior de populações devem ser testadas com a linhagem de *D. melanogaster white-peach*, juntamente com uma análise molecular por meio de outras técnicas como o *Southern Blot* que são menos sujeitas a problemas de contaminação.

Em relação aos fragmentos encontrados que assemelham-se aos do elemento *mariner* de *D. simulans*, não foi possível, até o momento, estabelecer o tamanho exato do elemento clonado, pois a seqüência de sobreposição não tem qualidade suficiente para assegurar este dado. Um seqüenciamento com um *primer* interno poderá sanar esta imprecisão.

## 2.8 Referências Bibliográficas

CAPY, P.; CHAKRANI, F.; LEMEUNIER, F.; HARTL, D.L. & DAVID, J.R. Active *mariner* transposable elements are widespread in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B** 242: 57-60, 1990.

CAPY, P.; KOGA, A.; DAVID, J.R.; HARTL, D.L. Sequence analysis of active *mariner* elements in natural populations of *Drosophila simulans*. **Genetics**, 150: 499-506, 1992.

GARZA, D.; MEDHORA, M.; KOGA, A. & HARTL, D.L. Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 128: 303- 310, 1991.

HARTL, D.L. Transposable element *mariner* in *Drosophila* species. In: **Mobile DNA**. D.E. Berg, M.M. Howe. (1. ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1989.

HAYMER, D.S. & MARSH, J.L. Germ line and somatic instability of a *white* mutation in *Drosophila mauritiana* due to transposable genetic element. **Develop. Genet.** 6: 281-191, 1986.

JACOBSON, J.W. & HARTL, E.D.L Coupled instability of two linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal e somatic mutability. **Genetics** 111: 57-65, 1985.

JACOBSON, J.W., MEDHORA, M.M. & HARTL, D.L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 8684-8688, 1986.

LABRADOR, M.; FARRÉ, M.; UTZET, F. & FONTDEVILA, A. Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvado*. **Mol Biol Evol.** 16 (7):931-937,1999.

LEMEUNIER, F.; DAVID, J.; TSACAS, L. & ASHBURNER, M. The melanogaster species group. In Ashburner *et al.* **The Genetics and Biology of Drosophila**, v 3. London: Academic Press, 1986.

LINDHOLM D.A.; LOHE, A.R. & HARTL, D.L. The transposable element *mariner* mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 134: 859–868, 1993.

LORETO, E.L.S; CARARETO, C.M.A & CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, 100(6): 545-54, 2008.

MARTINS, M.B.; PENA, J.A.N.; BITTENCOURT, R.N.. Traps for tropical drosophilids survey. **Drosophila Information Service**, 91: 91-91, 2008.

MARUYAMA, K; HARTL, D.L. Evidence for a interspecific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*. **J Mol Evol**, 33(6): 514- 524, 1991.

MEDHORA, M.; MARUYAMA, K. & HARTL, D.L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. **Genetics**, 128: 311-318, 1991.

MICHALAK, P. Epigenetic, transposons and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. **Heredity**, 102: 45- 50, 2009.

OLIVEIRA, L.F.V.; WALLAU, G.L. & LORETO, E.L.S. Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. **Electronic Journal of Biotechnology**. 12: 1 - 6, 2009.

PICOT, S.; WALLAU, G.L.; LORETO, E.L.; HEREDIA, F.O.; HUA-VAN, A.; CAPY, P. The *mariner* transposable elements in natural populations of *D. simulans*. **Heredity**, 101(1): 53- 59, 2008.

RUSSELL, A.L. & WOODRUFF, R.C. The genetics and evolution of the *mariner* transposable element in *Drosophila simulans*: worldwide distribution and experimental population dynamics. **Genetica** 105: 149-164, 1999.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology** 5:233-241, 1996.

TORRES, F.P.; FONTE, L.F.M.; VALENTE, V.L.S.; LORETO, E.L.S. Mobilization of a *hobo*-related sequence in the genome of *Drosophila simulans*. **Genetica**, 126: 101 - 110, 2006.

### 3. CONCLUSÕES

- Populações de *D. simulans*, mesmo quando situadas em regiões próximas, possuem variabilidade intrapopulacional com relação atividade de *mariner*. Um aumento no número de linhagens testadas de *D. simulans* reforçaria esta proposição e o uso da ferramenta qPCR (*Real Time*), traria rapidez e precisão à pesquisa.

- As isolinhagens de *D. melanogaster* testadas (2, 7, 8, 10, 13 e 16) apresentam o TE *mariner* inserido no seu genoma. Os fragmentos encontrados durante o estudo divergem do elemento na forma ativa, pois são menores que aquele encontrado originalmente em *D. simulans*.

- Podemos estar trabalhando com uma seqüência mais conservada que amplifica com os *primers* internos e outra mais degenerada que amplifica com os *primers* das TIRs ou com uma seqüência única que possui as terminações degeneradas e a parte interna conservada.

- Mais experiências de cruzamentos com esta população e o uso de outros instrumentos de pesquisa molecular, como PCR seguido de um Southern Blot, provavelmente elucidariam estas incertezas.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287(5461): 2185–2195, 2000.

BECKER, H.A. & LÖNNIG, W.E. Transposons: Eukaryotic. Encyclopedia of life sciences, 2001. Disponível em <<http://www.els.net>>. Acesso em: 24 de junho de 2007.

BIEMONT, C.; VIEIRA, C.; BORIE, N. & LEPETIT, D. Transposable elements and genome evolution: the case of *Drosophila simulans*. **Genetica** 107: 113-120, 1999.

BRYAN, G., D. GARZA & D. L. HARTL. Insertion and excision of the transposable element *mariner* in *Drosophila*. **Genetics**, 125: 103-114, 1990.

CAPY P.; BAZIN, C.; HIGUET, D. & LANGIN, T. **Dynamics and evolution of transposable elements**. Austin, Texas: Landes Bioscience, 1998. 197p.

CAPY, P.; CHAKRANI, F.; LEMEUNIER, F.; HARTL, D.L. & DAVID, J.R. Active *mariner* transposable elements are widespread in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B** 242: 57-60, 1990.

CAPY, P. & GIBERT, P. *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*: so similar yet so different. **Genetica** 120: 5-16, 2004.

CAPY, P.; KOGA, A.; DAVID, J.R.; HARTL, D.L. Sequence analysis of active *mariner* elements in natural populations of *Drosophila simulans*. **Genetics**, 150: 499-506, 1992.

CAPY, P.; LANGIN, T.; HIGUET, D.; MAURER, P. & BAZIN, C. Do the integrases of LTR-retrotransposons and class II element transposases have a common ancestor? **Genetica** 100(1-3): 63-72, 1997.

CAPY, P.; PLA, E. & DAVID, J.R. Phenotypic and geographical variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Geographical variations. **Genet Sel Evol** 25: 517-536, 1993.

CHAKRANI, F.; CAPY, P. & DAVID, J.R. Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. **Genet. Sel. Evol.** 25: 121-132, 1993.

CLARK, A.G *et al.* Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. **Nature**. 450: 203-218, 2007.

CRAIG, N.L. Mobile DNA: an introduction. p. 03-11. 2002. In: Craig, N.L.; Craigie, R.; Gellert, M. & Lambowitz, A.M. (eds.). **Mobile DNA II**. Washington, DC: ASM Press, 2002.

DAVID, J.R.; ALLEMAND, R; CAPY, P.; CHAKIR, M.; GIBERT, P.; PÉTAVY, G. & MORETEAU, B. Comparative life histories and ecophysiology of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica** 120: 151-163, 2004.

DAVID, J.R. & CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends Genet.** 4:106-111, 1988.

DAVID, J.R. & TSACAS, L. L'évolution des Drosophilides: l'oeil du paléontologiste et l'oeil du biologiste généticien. **Anais Colloq. Int. Cent. Natn. Rech. Scient.** 330: 249–257.1983

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics.** 5:103-107, 1989.

GARZA, D.; MEDHORA, M.; KOGA, A. & HARTL, D.L. Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 128: 303- 310, 1991.

GIRAUD, T. & CAPY P. Somatic activity of *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proc. R. Soc. Lond. B** 263: 1481-1486, 1996.

HARTL, D.L. Transposable element *mariner* in *Drosophila* species. In: **Mobile DNA**. D.E. Berg, M.M. Howe. (1<sup>o</sup> ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1989.

HAYMER, D.S. & MARSH, J.L. Germ line and somatic instability of a *white* mutation in *Drosophila mauritiana* due to transposable genetic element. **Develop. Genet.** 6: 281-191, 1986.

IRVIN, S.D.; WETTERSTRAND, K.A.; HUTTER, C.M.; & AQUADRO. C.F. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in New World populations. **Genetics** 150:777–790. 1998.

JACOBSON, J.W. & HARTL, E.D.L Coupled instability of two linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal e somatic mutability. **Genetics** 111: 57-65, 1985.

JACOBSON, J.W., MEDHORA, M.M. & HARTL, D.L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 8684-8688, 1986.

KAMINKER J.S. *et al* The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. **Genome Biol.** 3: research0084.1-0084.20, 2002.

KAPITONOV V.V. & JURKA J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100(11): 6569-6574, 2003.

KIDWELL M.G. & LISCH D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution Int. J. Org. Evolution** 55(1):1-24, 2001.

LABRADOR, M.; FARRÉ, M.; UTZET, F. & FONTDEVILA, A. Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvaldo*. **Mol. Biol. Evol.** 16 (7):931-937,1999.

LACHAISE, D. *et al*. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Evol. Biol.** 22: 159-225, 1988.

LACHAISE, D. & SILVAIN, J-F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals from Africa: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* riddle. **Genetica** 120:17-39, 2004

LEMEUNIER, F.; DAVID, J.; TSACAS, L. & ASHBURNER, M. The melanogaster species group. In Ashburner *et al*. **The Genetics and Biology of Drosophila**, v 3. London: Academic Press, 1986.

LINDHOLM D.A.; LOHE, A.R. & HARTL, D.L. The transposable element *mariner* mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 134: 859-868, 1993

LOHE, A.R. & HARTL, D.L. Autoregulation of *mariner* transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation. **Mol. Biol. Evol.** 13: 549-555,1996.

LORETO, E.L.S; CARARETO, C.M.A & CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, 100(6): 545-54, 2008.

LORETO, E.L.S.; SILVA, L.B.; ZAHA, A.; VALENTE, V.L.S. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. **Genetica** 101: 153–165, 1998.

MARTINS, M.B.; PENA, J.A.N.; BITTENCOURT, R.N.. Traps for tropical drosophilids survey. **Drosophila Information Service**, 91: 91-91, 2008.

MARUYAMA, K. & HARTL, D.L. Evidence for a interspecific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*. **J. Mol. Evol.**, 33(6): 514- 524, 1991.

MCDONALD J.F. Evolution and consequences of transposable elements. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 3: 855-864, 1993.

MEDHORA, M.; MARUYAMA, K. & HARTL, D.L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. **Genetics**, 128: 311-318, 1991.

MICHALAK, P. Epigenetic, transposons and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. **Heredity**, 102: 45- 50, 2009.

OLIVEIRA, L.F.V.; WALLAU, G.L. & LORETO, E.L.S. Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. **Electronic Journal of Biotechnology**. 12: 1 - 6, 2009.

PÉTAVY, G., DAVID, J.R; GIBERT, P; MORETEAU, B. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. **J. Therm. Biol.** 26: 29–39, 2001.

PICOT, S.; WALLAU, G.L.; LORETO, E.L.; HEREDIA, F.O.; HUA-VAN, A.; CAPY, P. The *mariner* transposable elements in natural populations of *D. simulans*. **Heredity**, 101(1): 53- 59, 2008.

ROUAULT, J. & DAVID, J.R. Evolutionary biology of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: a behavioural divergence in microhabitat selection. **Acta Oecologica/Oecologia Generalis**, 3: 331–338. 1982.

RUSSELL, A.L. & WOODRUFF, R.C. The genetics and evolution of the *mariner* transposable element in *Drosophila simulans*: worldwide distribution and experimental population dynamics. **Genetica** 105: 149-164, 1999.

SANMIGUEL P. *et al.* Retrotransposons in the Intergenic Regions of the *Maize* Genome. **Science** 274 (5288): 765-768, 1996.

SINGH, R.S.; CHOUDHARY, M. & DAVID, J.R. Contrasting patterns of geographic variation in the cosmopolitan sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Biochem. Genet.** 25: 27-40, 1987.

STADEN R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology** 5:233-241, 1996.

TORRES, F.P.; FONTE, L.F.M.; VALENTE, V.L.S.; LORETO, E.L.S. Mobilization of a *hobo*-related sequence in the genome of *Drosophila simulans*. **Genetica**, 126: 101 - 110, 2006.

VIEIRA, C; LEPETIT, D; DUMONT, S & BIEMONT, C. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 1251-1255, 1999.

VIEIRA, C.; NARDON, C.; ARPIN, C.; LEPETIT, D. & BIEMONT, C. Evolution of genome size in *Drosophila*. Is the invader's genome being invaded by transposable elements? **Molecular Biology and Evolution**, 19: 1154-1161, 2002.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P. & SHULMAN, A.H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature**. 8: 973-982, 2007.