



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

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE  
RETROTRANSPOSONS EM POPULAÇÕES NATURAIS DO  
GRUPO *CARDINI* DO GÊNERO *DROSOPHILA* (DIPTERA:  
*DROSOPHILIDAE*) DO SUL DO BRASIL**

**Dissertação de Mestrado**

**Juliana Cordeiro**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE  
RETROTRANSPOSONS EM POPULAÇÕES NATURAIS DO  
GRUPO *CARDINI* DO GÊNERO *DROSOPHILA* (DIPTERA:  
DROSOPHILIDAE) DO SUL DO BRASIL**

por

**Juliana Cordeiro**

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

**Orientadora: Vera Lúcia Valente Gaiety**

**Co-Orientador: Élgion Lúcio Silva Loreto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**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

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE RETROTRANSPOSONS  
EM POPULAÇÕES NATURAIS DO GRUPO *CARDINI* DO  
GÊNERO *DROSOPHILA* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) DO  
SUL DO BRASIL**

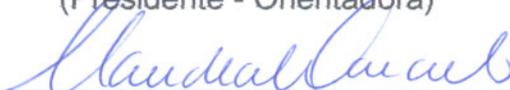
elaborada por  
**Juliana Cordeiro**

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

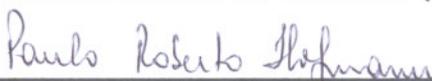
**COMISSÃO EXAMINADORA:**



**Dra. Vera Lúcia Valente Gaiésky**  
(Presidente - Orientadora)



**Dra. Cláudia Márcia A. Carareto (UNESP)**



**Dr. Paulo Roberto P. Hofmann (UFSC)**

Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2005.

Dedico este trabalho à minha persistência,  
que nos momentos mais difíceis  
me fez seguir a diante.

# Agradecimentos

É durante a realização de um trabalho que sentimos a necessidade de termos amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. Aqui, expresso minha gratidão:

Aos meus pais; meus orientadores eternos; que sem o empurrão, o apoio e o amor que me deram eu não teria sobrevivido ao mestrado. Amo vocês.

À Adri, Fê e Gui, meus cúmplices e irmãos que sempre me ajudaram independente da hora. Amo vocês.

À Dra. Vera Valente, que além de orientadora é uma grande amiga. Apesar dos desencontros, obrigada por ter apostado em mim.

Ao Dr. Élgion Loreto, pelo apoio que tornou possível este trabalho.

Ao povo do laboratório de Drosophila da UFRGS : Adri, Aninha, Grazia, Ju, Luís, Monica, Marícia, Maríndia, Ronaldo, Liz, Thiago, Rosane e Cláudia; por tudo que me ensinaram e por ter tornado o laboratório um ótimo lugar para permanecer desde de manhã até altas horas da noite.

Ao Fabiano Torres, por me ajudar em tuuudo mesmo.

Aos grandes amigos Marcão, Jonas, Hermes e Luis. Muito obrigada pelas moscas cedidas e pela convivência desde a época do Labster. Obrigada por tudo.

Ao Paulo Hofmann, Dani De Toni e Marcos Loureiro, por todo auxílio durante minha formação. Vocês são inesquecíveis.

À Sabrina, por estar sendo uma grande amiga e pelo apoio na mudança para Porto Alegre. Muito obrigada ao Jonas também.

À Moni, pelas risadas, festas, macarronadas, confissões, e principalmente pela amizade.

À Raquel, Milena e Andrés; por me ceder litros de água milli-q e pelas trocas de experiência.

Ao Dani Graichen e a Adri Ludwig; pela companhia no laboratório nos fins de semana. Pelo menos eu não era a única.

À Manu, Branca, Gisele, Vanessa, Carolzinha, Juline, Nina e Newton pela amizade, pelas ajudas e por tornar o Labdros e Santa Maria um lugar de bom convívio. Espero revê-los.

À Erika, Rubinho, Alcemar, Carlos e Luis pelos descontraídos cafezinhos no prédio 20 e por todo o apoio nesses dois anos. Adorei conhecê-los.

Ao Paulo, 'o secretário do curso', pelo apoio na burocracia do mestrado.

À Berê, Dani, Marcelo, Helena e D. Jane, pelos auxílios técnicos.

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

“Feliz aquele que transcreve o que sabe,  
o que aprende  
e o que ensina.”

**Cora Coralina**

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>CAPÍTULO 1 – Introdução</b> .....	12
1 Revisão e Justificativa .....	13
1.1 O grupo <i>cardini</i> .....	13
1.2 Elementos de transposição como fatores geradores de variabilidade.....	23
1.3 Classificação dos elementos de transposição .....	29
1.3.1 Elementos de Classe I.....	29
1.3.2 Elementos de Classe II.....	32
1.3.3 Elementos de Classe III.....	33
1.4 O retroelemento <i>micropia</i> .....	33
1.5 O retroelemento <i>gypsy</i> .....	34
2 Objetivos.....	36
<b>CAPÍTULO 2 - Distribuição dos elementos transponíveis <i>micropia</i> e <i>gypsy</i> em populações naturais de espécies do grupo <i>cardini</i> de <i>Drosophila</i> do sul do Brasil ...</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 3 – Conclusões</b> .....	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 4 – Perspectivas</b> .....	<b>67</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>70</b>

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Pós Graduação em Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brasil

# **Investigação sobre a presença de retrotransposons em populações naturais do grupo *cardini* do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) do Sul do Brasil**

Autora: Juliana Cordeiro

Orientadora: Vera Lúcia Valente Gaiesky

Co-orientador: Élgion Lúcio Silva Loreto

O grupo *cardini* faz parte do gênero *Drosophila* e tem sua distribuição descrita para a região dos Neotrópicos. Alguns estudos foram realizados com espécies deste grupo evidenciando a alta variabilidade encontrada nestas moscas. Por sua vez, os elementos de transposição possuem grande potencial para geração de variabilidade genética nos organismos em que estão presentes. Considerando estas afirmativas, este trabalho tem o objetivo de contribuir com os estudos moleculares, ecológicos e evolutivos dos elementos de transposição no grupo *cardini* e na família Drosophilidae; portanto, identificando a presença/ausência e analisando o padrão de distribuição dos retroelementos *micropia* e *gypsy* em dezesseis populações naturais de: *Drosophila cardinoides* (02), *D. neocardini* (05) e *D. polymorpha* (09) distribuídas nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Visando a busca por seqüências similares ao retroelemento *micropia* no genoma das populações, foi utilizado como sonda o elemento isolado de *D. hydei*. Verificou-se que o DNA de todas as populações analisadas apresentam forte sinal de hibridação, indicando que possivelmente as populações possuem seqüências muito similares à seqüência utilizada como sonda. A análise de parte da seqüência da transcriptase reversa do elemento *micropia*, através da técnica de PCR, nos indicou que todas as populações apresentam seqüências altamente similares ao par de 'primers' utilizados, entretanto as populações de *D. polymorpha* aparentemente possuem seqüências ligeiramente inferiores ao tamanho esperado de 812pb,

indicando que existem diferenças ao nível nucleotídico entre as seqüências presentes nas três espécies.

Na análise de presença de seqüências similares ao elemento *gypsy* isolado de *D. melanogaster* foi verificado que todas as populações apresentam seqüências que hibridaram com a sonda utilizada. *Drosophila cardinoides* apresentou de seis a sete bandas visíveis nos blots, *D. neocardini* apresentou de quatro a cinco bandas e *D. polymorpha* apresentou de uma a duas bandas. Quando foi utilizada a sonda referente à parte do gene *env* do elemento *gypsy* isolado de *D. polymorpha*, as populações de *D. polymorpha* apresentaram uma única banda nos blots, as populações de *D. neocardini* apresentaram três bandas e as populações de *D. cardinoides* apresentaram bandas muito fracas, mas utilizando maior tempo de exposição dos blots, as populações desta espécie mostraram ter de três a quatro bandas. De todas as populações de *D. neocardini*, foram obtidas bandas com sinais muito fracos quando hibridados com esta segunda sonda, o que indica um alto grau de divergência nucleotídica entre a sonda isolada de *D. polymorpha* e as seqüências existentes em *D. neocardini*.

Para as três sondas utilizadas neste trabalho: *gypsy* isolado de *D. melanogaster*, parte do gene *env* isolado do elemento *gypsy* de *D. polymorpha* e o elemento *micropia* isolado de *D. hydei*, verificamos a existência de variabilidade no padrão de bandas apresentado pelas diferentes populações. Para o elemento *micropia* verificamos também a existência de variabilidade no padrão de bandas entre as diferentes populações de mesma espécie.

## Abstract

Master's Thesis in Biology  
Program of Pos-Graduation in Animal Biodiversity  
Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brazil

# Investigation about the presence of retrotransposons in natural populations of the *cardini* group of the Genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) from the South of Brazil

Author: Juliana Cordeiro  
Adviser: Vera Lúcia Valente Gaiesky  
Co-Adviser: Élgion Lúcio Silva Loreto

The *cardini* group is part of the genus *Drosophila* and has its geographical distribution in the Neotropics. Some previous studies revealed the high variability in species of this group of flies. Transposable elements are recognized as capable of high potential for generation of genetic variability in the genomes of the organisms where they are present. Considering such assumptions, the present study has the objective to contribute with the molecular, ecological e evolutionary studies of the transposable elements in the *cardini* group of *Drosophila* and in the Drosophilidae family, to such, identifying the presence/absence and the patterns of distribution of the retroelements *microphia* and *gypsy* in sixteen natural populations of: *Drosophila cardinoides* (02), *D. neocardini* (05) and *D. polymorpha* (09) in the Brazilian States of Santa Catarina and Rio Grande do Sul.

Aiming to identify the presence of the retroelement *microphia* in the genome of these populations, a fragment isolated from the genome of *D. hydei* was used as probe. We verified that all populations here studied of the *cardini* group of *Drosophila* present strong signal of hybridization, indicating that possibly they have sequences very similar to the probe used in their genomes. The analysis of a part of the *microphia*'s reverse transcriptase sequence by the PCR technique shows that almost all the populations have sequences highly similar to the primers used, showing the expected fragment of 812pb. Although the populations of *D. polymorpha* presented a

fragment slightly smaller than those from *D. neocardini* and *D. cardinoides* showing differences at the nucleotide level between the sequences.

In the analyze of the presence of *gypsy* element isolated from *D. melanogaster's* genome, it was observed that all studied populations have DNA sequence homologies with the probe used. *Drosophila cardinoides* presented six to seven hybridization bands visible in the blots, *D. neocardini* presented four to five bands and *D. polymorpha* presented only one or two bands. When the probe used was a part of the *env* gene of the element *gypsy* isolated of *D. polymorpha*, the populations of *D. polymorpha* present a sole band in the blots, the populations of *D. neocardini* present three bands, and the populations of *D. cardinoides* only present very weak bands, but under exposition by a higher time, three to four bands appeared. From all populations of *D. neocardini* it was obtained bands with very faint signals. When hybridized with this second probe, indicating high nucleotide divergence between the probe isolated from *D. polymorpha* and the sequences present in the genome of *D. neocardini*.

For all three probes used in this study: *gypsy* isolated from *D. melanogaster*, part of the gene *env* isolated of the element *gypsy* from *D. polymorpha*, and the element *micropia* isolated from *D. hydei*, we verified the existence of variability in the banding patterns revealed by Southern Blot between the species. For *micropia*, this variability was verified among the different populations of the same species.

## **CAPÍTULO 1**

---

# **INTRODUÇÃO**

## 1. REVISÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1 O subgrupo *cardini*

A família Drosophilidae (Classe Insecta: Ordem Diptera) compreende mais de 3000 espécies (Ashburner, 1989) conhecidas vulgarmente por moscas-da-fruta. Estas espécies estão agrupadas em 62 gêneros, dos quais 25 são descritos originalmente para a região neotropical (Val, Vilela & Marques, 1981). Existem, entretanto, poucos estudos referenciando o grupo *cardini* de moscas pertencentes à família Drosophilidae, apesar de sua alta representatividade na região Neotropical (Val, Vilela & Marques, 1981).

O gênero *Drosophila* pertence à família Drosophilidae, subfamília Drosophilinae. Dentro desta subfamília existem 40 gêneros descritos. O maior deles é o gênero *Drosophila* composto por 15 subgêneros agrupando 1400 espécies já descritas. Entre os 15 subgêneros descritos para o gênero *Drosophila*, merece destaque o subgênero *Drosophila* pelo alto número de espécies apresentadas, 759 espécies, seguido pelo subgênero *Sophophora* com 233 espécies (revisão em Wheeler, 1981)

Registros fósseis datam a origem da família Drosophilidae entre 50 a 60 milhões de anos atrás e existem várias evidências que apontam para uma origem tropical da família Drosophilidae (Trockmorton, 1975). Presume-se que o subgênero *Drosophila* originou-se nos trópicos do velho mundo há cerca de 42 milhões de anos, e então se espalhou para o novo mundo. A primeira radiação de espécies pertencentes ao gênero *Drosophila* teria ocorrido com a origem do subgênero *Scaptodrosophila*, assim como a radiação *Sophophora*, que teria ocorrido em um segundo tempo (Trockmorton, 1975).

A radiação que originou o subgênero *Drosophila* foi a mais complexa e sofreu várias sub-radiações que ocorreram posteriormente às radiações já mencionadas. O grupo *cardini* está compreendido dentro da radiação *tripunctata* deste subgênero, que teve sua origem no Novo Mundo (Trockmorton, 1975).

Heed & Russel (1971) propuseram um modelo para a distribuição geográfica do grupo *cardini* baseado em estudos de inversões cromossômicas e

compatibilidade de cruzamentos entre as espécies. Concluíram que provavelmente uma linhagem de *D. cardinoides*, ou um ancestral seu, teria dado origem às demais espécies do grupo. Segundo esses autores, *D. cardinoides*, *D. neomorpha* e *D. parthenogenetica* especiaram-se na América Central e, através da Colômbia, migraram para o Sul e Leste do continente americano. Já *D. polymorpha*, *D. procardinoides* e *D. neocardini* especiaram-se no sul da América do Sul, sendo que somente *D. polymorpha* atingiu a distribuição até a Colômbia.

O grupo *cardini*, portanto, faz parte do subgênero *Drosophila* e foi denominado por Sturtevant no ano de 1942 (*apud* Heed & Krishnamurthy, 1959). As 16 espécies pertencentes a este grupo estão subdivididas em três subgrupos de acordo com características da morfologia externa e da genitália masculina (Heed, 1962; Heed & Russel, 1971). A Tabela 1 mostra as espécies pertencentes ao grupo *cardini* bem como seus subgrupos.

TABELA 1: Distribuição das espécies do grupo *cardini* nos seus respectivos subgrupos.

Gênero	Grupo	Subgrupo	Espécie	
<i>Drosophila</i>	<i>cardini</i>	<i>cardini</i>	<i>D. bedichecki</i>	Heed & Russel, 1971
			<i>D. cardini</i>	Sturtevant, 1916
			<i>D. cardinoides</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943
			<i>D. neocardini</i>	Streisinger, 1946
			<i>D. parthenogenetica</i>	Stalker, 1953
			<i>D. polymorpha</i>	Dobzhansky & Pavan, 1943
		<i>dunni</i>	<i>D. procardinoides</i>	Frydenberg, 1956
			<i>D. antillea</i>	Heed, 1962
			<i>D. arawakana</i>	Heed, 1962
			<i>D. belladunni</i>	Heed & Krishnamurthy, 1959
			<i>D. caribiana</i>	Heed, 1962
			<i>D. dunni</i>	Townsend & Wheeler, 1955
		<i>acutilabella</i>	<i>D. nigrodunni</i>	Heed & Wheeler, 1957
			<i>D. similis</i>	Williston, 1896
			<i>D. acutilabella</i>	Stalker, 1953
			<i>D. neomorpha</i>	Heed & Wheeler, 1957

Fonte: Heed (1962) e Heed & Russel (1971).

De uma forma geral, o subgrupo *dunni* é composto por sete espécies distribuídas nas ilhas do Caribe; o subgrupo *cardini* é composto por sete espécies continentais e o subgrupo *acutilabella* por uma espécie na Flórida (EUA) e uma nas Grandes Antilhas;

Segundo Val, Vilela & Marques (1981), Goñi, Martinez & Daguer (1997) e Vilela, da Silva & Sene (2002), o subgrupo *cardini* tem a distribuição de suas espécies da seguinte forma:

- *D. bedicheki* é descrita para a ilha de Trinidad;
- *D. cardini* e *D. cardinoides* distribuídas desde o México até o sul do Brasil e Chile;
- *D. neocardini* ocorrendo na Colômbia, Brasil, Peru e Panamá;
- *D. parthenogenetica* descrita para Colômbia, Nicarágua, Honduras e Trinidad Tobago;
- *D. polymorpha* distribuída desde a Guatemala até o Brasil incluindo Trinidad e Granada; e
- *D. procardinoides* descrita para o Peru, Bolívia e Brasil.

As espécies com ocorrência já descrita para os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são *D. cardini*, *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* (De Toni, 1998), e em 2004 teve-se o primeiro registro de ocorrência das espécies *D. neomorpha* e *D. parthenogenetica* para o estado de Santa Catarina (De Toni *et al.*, 2004; artigo submetido para publicação).

Em território brasileiro, *D. cardini* e *D. cardinoides* têm sido encontradas em ambientes com baixa umidade e *D. polymorpha* em florestas e ambientes abertos, porém, não secos (Sene *et al.*, 1980). Nas coletas realizadas no Estado de Santa Catarina, em uma área coberta por Mata Atlântica na Ilha de Santa Catarina, De Toni & Hofmann (1994) encontraram *D. polymorpha* em todos os meses do ano. Foram coletados apenas poucos espécimens de *D. neocardini*, enquanto *D. cardini* e *D. cardinoides* não foram encontradas neste ambiente (De Toni, 1998).

Recentemente, Gottschalk (2004) coletou *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* em pontos com diferentes níveis de urbanização na cidade de Florianópolis – SC, e verificou uma alta frequência de *D. polymorpha* nos pontos com menor alteração provocada pelo homem, como no Morro da Lagoa da Conceição e no Morro da Cruz e em pontos menos conservados como o centro da cidade de Florianópolis. Neste estudo, *D. cardinoides* teve sua maior frequência em

locais mais urbanizados como no centro da cidade de Florianópolis e no campus da Universidade Federal de Santa Catarina.

Embora Heed & Russel (1971) e Sene *et al.* (1980) mencionem coletas de *D. cardini* no Brasil, poucos trabalhos mais recentes possuem registros desta espécie apresentando uma freqüência pouco maior em ambientes mais urbanizados (Schmitz, 2004; Gottschalk, 2004).

Para *D. neocardini*, os trabalhos anteriormente citados, juntamente com o de De Toni (2002), obtiveram uma freqüência intermediária desta espécie em seus pontos de coleta que incluem ambientes de Mata Atlântica, ambientes com diferentes níveis de urbanização e ambientes de mangue; porém *D. neocardini* nunca foi coletada em áreas de vegetação de cerrado e caatingas (Sene *et al.*, 1980).

*Drosophila polymorpha*, apesar de ter preferência por locais úmidos, foi coletada nos diferentes ambientes acima citados, inclusive em uma área de restinga muito próxima de um condomínio residencial (Bizzo, L. E.; dados não publicados).

Estudos citogenéticos com três espécies do grupo *cardini*, *D. dunnii*, *D. acutilabella* e *D. belladunni*, foram realizados por Heed & Krishnamurthy (1959) em populações das ilhas da América Central. Uma parte do estudo foi direcionada aos cruzamentos entre diferentes populações de *D. dunnii*, e foi verificado que os cruzamentos apresentaram taxas de fertilidade diferenciadas e alguns deles apresentaram prole híbrida totalmente estéril. Também ficou evidente a existência de uma clina na variação da pigmentação abdominal nestas espécies. Payant (1986) sugere que moscas mais pigmentadas teriam maior proteção contra dissecação em regiões de climas mais frios; porém ainda é desconhecida a razão fisiológica para tal vantagem. Geralmente é aceito que as clinas de variação de traços morfológicos são resultados da adaptação da população local respondendo às diferenças ambientais impostas seguindo um padrão de distribuição direcionado.

Os resultados obtidos por Machado, De Toni & Hofmann (2001) corroboram as idéias de Payant (1986). Os primeiros autores, trabalharam com a variação da pigmentação abdominal de *D. polymorpha* oriundas de ilhas do estado de Santa Catarina. Eles observaram uma elevação na freqüência de indivíduos com fenótipo mais escuro durante os períodos de temperatura mais baixa. Os dados desses autores confirmam a hipótese de que diferenças na temperatura podem modificar a estrutura de uma população em relação ao padrão de pigmentação corporal, não

apenas alterando as frequências alélicas mas também através da plasticidade fenotípica.

Outros trabalhos que estudaram o polimorfismo para a pigmentação dos tergitos abdominais de *D. polymorpha* são os de Da Cunha (1949), Heed (1963), Heed & Blake (1963), Martinez & Cordeiro (1970). Esses trabalhos propuseram a existência de alelos co-dominantes e alelos modificadores da coloração abdominal atuando conjuntamente na geração do padrão de coloração presente nos indivíduos desta espécie.

Da Cunha (1949) reportou três padrões para a coloração abdominal de *D. polymorpha* denominados de padrão fraco, intermediário e forte (Figura 1), e sugeriu que tal padrão possivelmente era condicionado por dois alelos co-dominantes, 'E' e 'e', com segregação autossômica. É interessante notar que Heed & Krishnamurthy (1959) comentam que os indivíduos de *D. polymorpha* presentes nas Ilhas do Caribe não são tão polimórficas para a coloração abdominal quanto os indivíduos desta espécie estudados por Da Cunha (1949).

Mais tarde, Da Cunha (1953) propôs que indivíduos heterozigotos possuíam um maior valor adaptativo em relação aos indivíduos homozigotos. Para tentar explicar tal afirmação, apresentou duas hipóteses possíveis: a) um maior efeito adaptativo para indivíduos heterozigotos, devido a um efeito pleiotrópico dos dois alelos; ou; b) devido à possível existência de genes condicionadores de pigmentação proximamente ligados aos genes determinantes da cor do abdômen destas moscas.

Martinez & Cordeiro (1970) sugeriram a existência de alelos modificadores da coloração, identificados por 'm', os quais segregariam em um *locus* independente do *locus* principal 'e', intensificando o fenótipo determinado pelos alelos 'E' e 'e'.

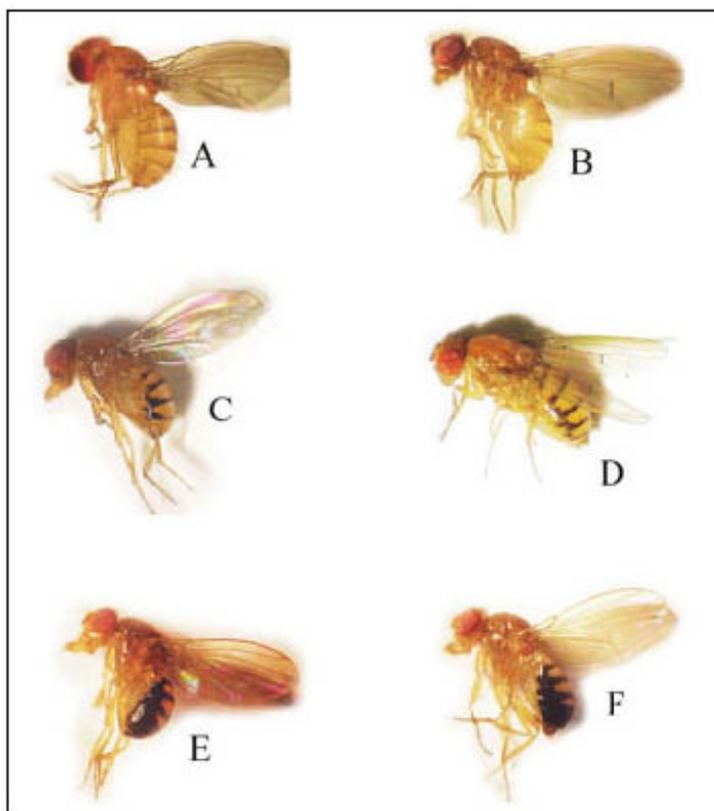


FIGURA 1: Indivíduos de *Drosophila polymorpha* mostrando os diferentes padrões de coloração dos tergitos abdominais, proposto por Da Cunha (1949): fenótipo claro (A. macho, B. fêmea); fenótipo intermediário (C. macho, D. fêmea) e fenótipo escuro (E. macho, F. fêmea) (Extraída de Machado, De Toni & Hofmann, 2001).

O grupo da Dra. Hollocher (Universidade de Notre Dame, Indiana, EUA) vem estudando o polimorfismo de pigmentação apresentado pelas espécies do subgrupo *dunni* espalhadas pelas ilhas do Caribe. Seus estudos demonstram que a existência de clinas de variação latitudinal da pigmentação abdominal nas moscas deste subgrupo (Figura 2), que já havia sido delineado por Heed & Krishnamurthy (1959), ainda persistem e é percebido para as demais espécies do subgrupo *dunni* existentes naquela região. A análise feita por Hollocher, Hatcher & Dyreson (2000a) revela que toda a intensidade de pigmentação achada nestas espécies tem sido regulada por seleção natural imposta pelo ambiente em que se encontram. Ainda verificaram a existência de uma taxa de mudança acelerada favorecendo as espécies mais escuras. Em um outro estudo, Hollocher, Hatcher & Dyreson (2000b)

constatarem que a expressão da pigmentação nas diferentes áreas do abdômen se encontra sob um controle genético diferenciado que atua separadamente nas diferentes áreas.

Outro polimorfismo bastante estudado no grupo *cardini* é o polimorfismo para inversões de seqüências cromossômicas claramente detectado nos cromossomos politênicos das glândulas salivares larvais. Através dos estudos das seqüências de bandas ou faixas destes cromossomos, pode-se verificar que durante a evolução do gênero *Drosophila* aconteceram reorganizações cromossômicas, especialmente as inversões dos segmentos, que se fixaram em cada espécie. Segundo Da Cunha, Burla & Dobzhansky (1950) e Da Cunha *et al.* (1959), a quantidade de polimorfismo encontrada em uma espécie reflete a variedade de nichos ecológicos ocupados por suas populações, pois esses polimorfismos representam características que adaptaram os indivíduos da espécie à tal ambiente.

Da Cunha, Brncic & Salzano (1953) estudaram o polimorfismo cromossômico em *D. polymorpha* e *D. cardinoides* e observaram que a primeira é mais polimórfica, apresentando seis inversões diferentes contra três inversões encontradas na última.

Rohde & Valente (1996a) compararam populações de *D. polymorpha* e *D. cardinoides* provenientes de locais com diferentes graus de urbanização da cidade de Porto Alegre, observando a dinâmica de população e preferências por sítios de ovoposição e alimentação destas espécies. As duas espécies são simpátricas na cidade de Porto Alegre e o principal fator responsável pela separação dos nichos parece ser a origem dos frutos explorados e a preferência por diferentes condições climáticas. Estas estratégias estão claramente relacionadas com mecanismos que evitam competição entre indivíduos de espécies diferentes. *Drosophila polymorpha* foi freqüentemente encontrada em coletas realizadas em dias frios e secos, ocorrendo o oposto com *D. cardinoides*. Porém, De Toni, Herédia & Valente (2001) relacionaram a abundância de *D. polymorpha* de forma direta como os níveis de umidade, encontrando resultados diferentes aos de Rohde & Valente (1996a).

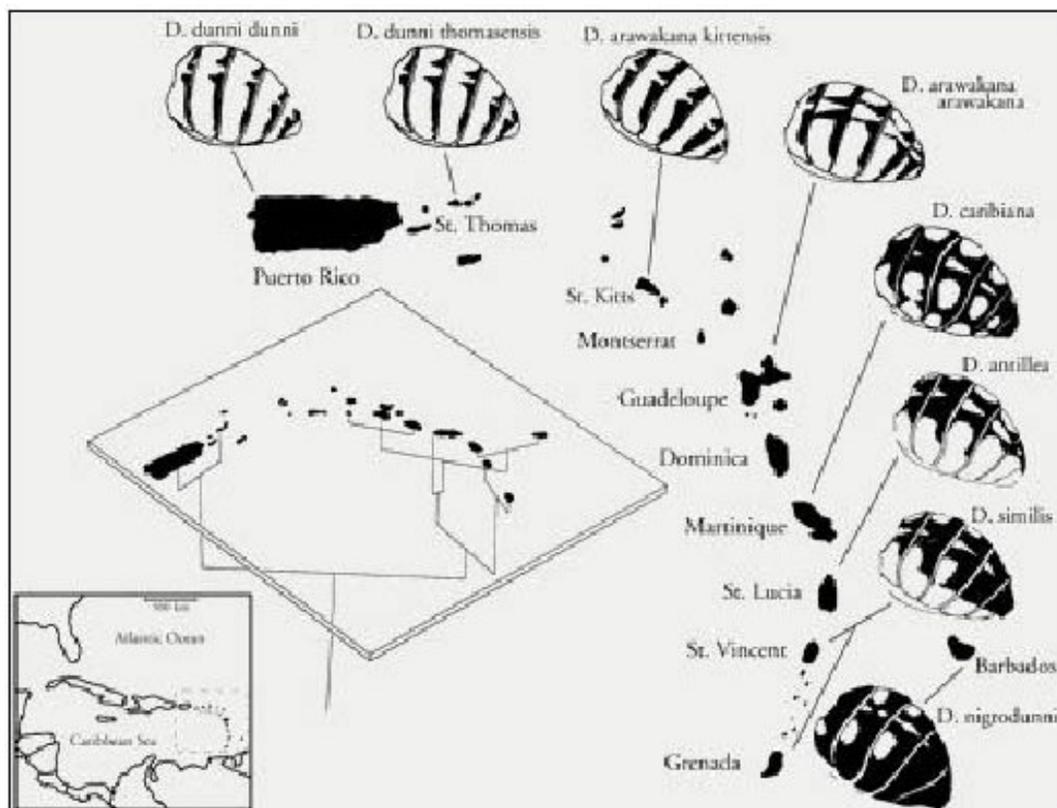


FIGURA 2: Padrão da coloração abdominal dos indivíduos fêmeas das diferentes espécies do subgrupo *dunni* presente nas ilhas do Caribe segundo Heed & Krishnamurthy 1959 (Extraída de Hollocher, Hatcher & Dyreson, 2000a).

Em outro trabalho, Rohde & Valente (1996b) construíram mapas fotográficos de cromossomos politênicos para *D. cardinoides* e *D. polymorpha* e De Toni *et al.*, (2001) construíram o fotomapa de *D. neocardini*. Rohde e Valente (1996b) encontraram dados divergentes em relação aos de Da Cunha, Brncic & Salzano (1953), *D. cardinoides* se mostrou mais polimórfica, com quatro inversões diferentes, contra uma inversão de *D. polymorpha*, porém existe a possibilidade de esses dados serem reflexo do tamanho amostral utilizado nas análises.

De Toni, Herédia & Valente (2001) analisaram o polimorfismo cromossômico de *D. polymorpha* e encontraram sete inversões diferentes nas comunidades estudadas no estado de Santa Catarina. As autoras observaram ainda que as populações insulares apresentaram-se mais polimórficas do que as populações continentais. De acordo com Da Cunha, Brncic & Salzano (1953), isto ocorre em virtude de ilhas representarem uma maior heterogeneidade ambiental quando

comparadas com áreas maiores, proporcionando uma maior variabilidade e disponibilidade de nichos possíveis de serem explorados pelas moscas.

Apesar da sua ubiqüidade na região neotropical e do grande interesse despertado para estudos do efeito de isolamento, como é o caso do subgrupo *dunni* nas Ilhas do Caribe; o grupo *cardini* ainda foi pouco estudado do ponto de vista molecular. Os trabalhos existentes realizados com este grupo são os de Napp & Cordeiro (1978, 1981) com polimorfismos enzimáticos, os de Colon-Parrilla & Perez-Chiesa (1999) e Wilder & Hollocher (2003) com genes nucleares, Wilder *et al.* (2002) com seqüências de microssatélites, Pelandakis & Solignac (1993) com DNA mitocondrial, e os de Loreto *et al.* (1998), Wilder & Hollocher (2001) e Herédia, Loreto & Valente (2004) com elementos de transposição.

O trabalho de Napp & Cordeiro (1981) demonstrou que os padrões eletroforéticos de várias enzimas apresentados pelas espécies do grupo *cardini* respaldam as relações esperadas de similaridade entre espécies mais próximas evolutivamente, de acordo com o parentesco apresentado por Heed & Russel (1971).

Wilder & Hollocher (2003) estudaram variações intra e interespecíficas de seqüências de DNA de quatro *locus* genéticos não ligados entre populações do subgrupo *dunni* com a finalidade de analisar o processo de especiação que ocorreu entre estas espécies endêmicas das Ilhas do Caribe. Os dados indicaram a ocorrência de dois eventos principais de especiação entre as espécies deste subgrupo, um entre 1,6 e 2,6 milhões de anos atrás e o outro evento há 96 mil anos atrás. As autoras sugerem que eventos de gargalo de garrafa ligados a efeito de fundador delinearam a história evolutiva do subgrupo *dunni*. Estas autoras ainda apontam para o rápido isolamento reprodutivo e o estabelecimento de distintos padrões de pigmentação abdominal ocorridos nas espécies durante este processo.

Realizando um estudo de ampla varredura em busca de seqüências de microssatélites, Wilder *et al.* (2002) verificaram a presença de oito *locus* dessas seqüências em todas as doze espécies do grupo *cardini* testadas, sendo notada a variabilidade no número de repetições. Porém essas seqüências não foram amplificadas em espécies pertencentes à mesma radiação evolutiva do grupo *cardini*, ou seja, espécies muito próximas ao grupo. O uso de tais seqüências, portanto, não é recomendada para análises filogenéticas realizadas com espécies

fora do grupo *cardini*. As autoras concluem que essas seqüências possivelmente foram perdidas nas linhagens dessas espécies proximamente relacionadas.

Pélandakis & Solignac (1993) analisaram seqüências do RNA ribossomal 28S de 72 espécies da família Drosophilidae, entre elas *D. arawakana* do subgrupo *dunni*, e construíram uma filogenia baseada nessas seqüências. Desta forma, verificaram a formação de alguns agrupamentos que não correspondiam à hierarquia taxonômica apresentada por Trockmorton (1975) mas que eram suportados por outros estudos. A linhagem *immigrans-phalerata*, definida pela filogenia por RNA ribossomal e na qual o grupo *cardini* está inserido, correspondeu muito bem à radiação *immigrans-Hirtodrosophila* proposta por Trockmorton (1975) que foi configurada através de dados morfométricos, citogenéticos, ecológicos e geográficos de distribuição das espécies do gênero *Drosophila*.

Wilder & Hollocher (2001) identificaram uma nova classe de retroposons em espécies do grupo *cardini*, os elementos *mini-me*, que possuem relação com a geração de microssatélites em *Drosophila*. Esses elementos apresentam duas regiões internas muito semelhantes a seqüências nucleotídicas presentes em seqüências de microssatélites e são elementos abundantes no genoma, representando 1,2% do genoma de *D. melanogaster*. Portanto, a mobilização destes elementos poderia ter gerado regiões de microssatélites nas espécies analisadas pelos autores.

Loreto *et al.* (1998) incluíram *D. polymorpha*, *D. cardini* e *D. cardinoides* em um amplo estudo sobre a presença de cinco elementos transponíveis no genoma de 33 espécies de 11 grupos neotropicais. Dos cinco elementos de transposição testados (*gypsy*, *P*, *mariner*, *hobo*, *I*), somente *gypsy* foi detectado no genoma das espécies estudadas do grupo *cardini*. Herédia, Loreto & Valente (2004) analisaram parte da seqüência do gene *env* do retroelemento de transposição *gypsy* em 41 espécies de *Drosophila*, inclusive *D. polymorpha* e *D. neocardini*, verificando seqüências nucleotídicas diferentes em espécies muito próximas filogeneticamente.

A seqüência do elemento *gypsy* isolada, quando analisada do ponto de vista filogenético, apresentou inconsistências agrupando espécies separadas taxonomicamente. No estudo de Herédia, Loreto & Valente (2004) fica clara a existência de eventos de transferência horizontal deste elemento durante a evolução das espécies, o que tornou possível a explicação de certas inconsistências. Foi verificado que *D. neocardini* participou, juntamente com *D. nebulosa* (subgênero

*Sophophora*, grupo *willistoni*), de um dos processos de transferência horizontal identificados, pois a seqüência analisada do elemento *gypsy* se mostrou muito semelhante à seqüência presente nesta segunda espécie divergindo da seqüência isolada de *D. polymorpha*.

As espécies do grupo *cardini*, portanto, mostram-se promissores objetos potenciais de estudo em pesquisas de variabilidade, sendo visível o alto grau de polimorfismo cromossômico e de pigmentação presentes no grupo.

## **1.2 Elementos de transposição como fatores geradores de variabilidade**

A mobilidade de seqüências do DNA foi primeiramente sugerida no final dos anos 40, antes mesmo da descoberta da estrutura molecular do DNA, quando Bárbara McClintock descreveu os “elementos controladores”. Neste período um dos dogmas da ciência era o princípio estático do genoma e a única mudança aceitável relacionava-se àquela proporcionada pelos processos evolutivos (Kidwell & Lisch, 2001).

Atualmente esta instabilidade tem sido amplamente aceita pela comunidade científica, e sabe-se que o genoma está sujeito a vários fatores que proporcionam sua variabilidade como as mutações, inserções e deleções. Outro fator que gera instabilidade são os elementos de transposição (TEs) descobertos por Bárbara McClintock. Nos anos de 1945 e 1946, durante um estudo utilizando sementes de milho, esta pesquisadora verificou um padrão incomum na expressão e segregação dos determinantes da coloração da aleurona dos grãos. Tal acontecimento só poderia ser explicado por “partículas móveis” presentes neste genoma. Desde então, estes elementos móveis foram encontrados em todas as espécies onde já foram pesquisados (revisões em Craig, 2002 e Capy, Anxolabéhère & Langin, 1994).

Elementos de transposição são seqüências de DNA que têm a capacidade de mudar de posição no genoma, independente de homologies entre as regiões. Esta transposição pode ocorrer de forma autônoma, quando os elementos produzem suas próprias enzimas que promovem sua mobilização; ou podem ser não-autônomos, os quais dependem das enzimas produzidas pelos elementos

autônomos. Eles ainda possuem características de parasitas moleculares por se aproveitarem da estrutura proporcionada pela célula, promovendo a sua própria duplicação. Além disso, os elementos de transposição estão sujeitos a altas taxas de mutação e a uma alta pressão seletiva, levando a um aumento na frequência de elementos incompletos e não autônomos (revisões em Craig, 2002; Capy Anxolabéhère & Langin, 1994; Kidwell & Lisch, 2001).

A natureza parasítica dos elementos de transposição, por um lado, é explicada pela sua habilidade de invadir novos genomas sem encontrar restrições durante a invasão. Kidwell & Lisch (1997) caracterizaram o “ciclo de vida” de um elemento em um genoma hospedeiro. Inicialmente existe uma rápida fase de invasão, caracterizada pelo aumento do número de cópias juntamente com possíveis mutações resultando em elementos inativados. Na segunda fase deste ciclo, tem-se o período de maturidade onde existe um balanço entre a amplificação e a perda do número de cópias. Finalmente, um estágio de senescência, onde já não existem elementos autônomos nem aumento do número de cópias, e as seqüências não autônomas também são perdidas, tornando-se seqüências deletadas ou divergentes. Portanto, é possível encontrar em um genoma: cópias de elementos ativos, cópias de elementos totalmente inativados, e cópias de elementos inativos mas que respondem à ativação de um elemento ativo.

Existem outras características intrínsecas aos elementos de transposição que, segundo Kidwell & Lisch (1997) e Capy *et al.* (1998), são:

- a) sua capacidade de proporcionar duplicação no sítio de inserção, que pode ser próximo ou dentro de um gene ou em regiões heterocromáticas do cromossomo;
- b) seu polimorfismo de sítios de inserção e aparentemente não possuem preferência por localização cromossômica; e
- c) sua variabilidade no número de cópias entre e dentro das espécies; quando estão no estado ativado são entidades independentes capazes de autoduplicação.

Um dos maiores impactos no genoma hospedeiro causado pela presença e movimentação desses elementos transponíveis está relacionado com o aumento da variabilidade genética (Capy *et al.*, 1998; Kidwell & Lisch, 1997). Esta variabilidade pode colaborar com a geração de uma melhoria na adaptabilidade dos indivíduos portadores, ou pode gerar danos ao genoma hospedeiro que, por sua vez, passa a

controlar a mobilização dos elementos de transposição, chegando a uma possível desativação desses elementos.

Alguns desses elementos móveis possuem regiões preferenciais para sua inserção, podendo ser regiões distantes de seqüências gênicas do hospedeiro, como regiões intergênicas, heterocromáticas ou regiões internas de outros elementos. Porém existem elementos de transposição que parecem apresentar certa preferência por sítios de inserção localizados próximos ou dentro das seqüências gênicas. As conseqüências dessas mobilizações são bruscas indo desde deleções, substituições e inserções de nucleotídeos até rearranjos gênicos e cromossômicos (Kidwell & Lisch, 1997).

Classicamente, as inversões cromossômicas encontradas em *Drosophila* são consideradas resultados de quebras ocorridas por eventos independentes e não recorrentes. Trabalhos mais recentes evidenciam o papel dos elementos de transposição na possível origem de polimorfismos para inversões cromossômicas em populações naturais (revisão em Krimbas & Powell, 1992; Cáceres *et al.*, 1999; Cáceres, Puig & Ruiz, 2001; Rohde, 2000; Casals, Cáceres & Ruiz, 2003; Puig Cáceres & Ruiz, 2004). As inversões cromossômicas por sua vez são potenciais geradoras de modificações gênicas uma vez que podem promover a ruptura de um gene, ou podem modificar o padrão de segregação dos genes que estão presentes na inversão, dada a formação de supergenes; ou ainda, pelo efeito de posição, podem alterar a expressão de genes vizinhos. Uma variedade de efeitos de posição tem sido observada em mutações espontâneas geradas por inversões em diversos organismos. Outra conseqüência das inversões cromossômicas é a remoção ou modificação de seqüências regulatórias de genes alterando desta forma sua expressão. Podem ainda provocar o deslocamento de genes para lugares distantes onde sua expressão será alterada ou silenciada pela proximidade da heterocromatina centromérica (revisão em Cáceres *et al.*, 1999; Puig, Cáceres & Ruiz, 2004).

Alguns trabalhos mostram claramente a existência de regiões onde são encontradas altas freqüências de quebras cromossômicas no cariótipo de várias espécies de *Drosophila*, o que pode descartar a hipótese de aleatoriedade para quebras cromossômicas geradoras de inversões (Kidwell & Holyoake, 2001). Cáceres *et al.* (1999) estudaram a participação de elementos de transposição em uma inversão cromossômica amplamente distribuída nas populações de *D. buzzatii*

(subgênero *Drosophila*, grupo *repleta*). Esses autores verificaram que existia uma inserção de um elemento transponível similar aos elementos de classe II na região de ponto de quebra da inversão e o nomearam de *Galileo*. Este elemento apresentou padrão de hibridação diferenciado entre as linhagens estudadas, indicando sua recente ativação no genoma hospedeiro.

Mais tarde, Puig, Cáceres & Ruiz (2004), estudando um gene próximo do ponto de quebra da mesma inversão de *D. buzzatii* acima citada, verificaram que o elemento *Kepler*, um transposon *Foldback-like* pertencente à classe III de elementos de transposição, encontrava-se próximo da inversão estudada e atuava sobre a expressão daquele gene através de um evento de interferência por RNA. Esses autores encontraram uma redução na expressão do gene em questão em linhagens homozigotas para a inversão analisada, identificando a expressão de um RNA antisenso produzido pelo elemento *Kepler* que pode estar envolvido na possível interferência da expressão do gene.

Segundo Puig, Cáceres & Ruiz (2004), a transposição e a recombinação entre as cópias de elementos de transposição de uma mesma família presente no genoma podem gerar desde mutações pontuais até a reestruturação de genomas inteiros. Essas alterações, na maioria das vezes, são negativas para o genoma hospedeiro, pois promovem a instabilidade genômica.

Efeitos maiores da mobilização dos elementos de transposição podem ser observados em características fenotípicas, como a geração de prole estéril, já estudada para os elementos de transposição *P*, *I* e *hobo*, efeito conhecido por disgenesia do híbrido (Kidwell & Kidwell, 1979; Rio, 2002). A síndrome da disgenesia do híbrido é caracterizada pela mobilização do elemento de transposição durante as divisões celulares da linhagem germinativa de moscas consideradas híbridas, ou seja, a prole do cruzamento entre machos que possuem o elemento de transposição e fêmeas que não o possuem. Desta forma, não existe um controle da mobilização do elemento nos zigotos, gerando moscas que podem ser total ou parcialmente estéreis por atrofia gonadal. Segundo Hurst & Schilthuisen (1998), a ocorrência desta síndrome em uma parcela de uma população pode fornecer uma relação entre os elementos de transposição e a origem de isolamento reprodutivo.

Os elementos de transposição estão relacionados, ainda, com a hipermutabilidade gênica, podendo resultar em fenótipos nulos ou letais, ou até gerar um novo padrão de expressão fenotípica quando se inserem na região

reguladora de um gene (Herédia, 2002; Kidwell & Lish, 1997, 2001). Também estão ligados a modificações no tamanho do genoma hospedeiro, cujo aumento nem sempre é proporcional ao seu grau de complexidade, fator conhecido como o paradoxo do valor C (Vieira *et al.*, 2002); e ligados a efeitos de transmissão horizontal, ou seja, a troca de genes entre espécies reprodutivamente isoladas, através de um vetor intermediário (Capy *et al.*, 1998; Herédia, Loreto & Valente, 2004).

Silva, Loreto & Clark (2004) descreveram os fatores e as características referentes a um evento de transmissão horizontal. Segundo os autores, quando um determinado elemento de transposição é transmitido verticalmente, é esperado que sua história filogenética acompanhe a filogenia dos seus hospedeiros. Caso este tipo de conclusão não possa ser retirada em um estudo, parte-se em busca de dados que suportem a inferência de um evento de transmissão horizontal.

Três tipos de distorção na filogenia do elemento de transposição podem indicar a ocorrência deste evento. A primeira distorção é a detecção de elementos com alto grau de similaridade das seqüências de nucleotídeos entre espécies de taxa divergentes. A segunda, a detecção de diferenças entre as filogenias realizadas a partir das seqüências do elemento de transposição e a filogenia das espécies hospedeiras. A terceira distorção diz respeito à amplitude de distribuição do elemento de transposição, podendo estar presente em uma espécie e ausente em outra espécie pertencente ao mesmo grupo filogenético (Silva, Loreto & Clark, 2004). Recentemente, Herédia, Loreto & Valente (2004) inferiram a ocorrência de alguns eventos de transmissão horizontal para explicar a evolução do retroelemento *gypsy* na família Drosophilidae. Um desses eventos parece ter ocorrido entre as espécies *D. neocardini* (grupo *cardini*) e *D. nebulosa* (grupo *willistoni*).

A maioria das mutações produzidas pelos elementos de transposição é neutra ou deletéria, mas apesar de poder provocar “danos” ao genoma onde estão inseridos, esses elementos podem ser domesticados pelo hospedeiro (Miller, McDonald & Pinsker, 1997; Kidwell & Lisch, 1997), auxiliando o genoma em certas funções básicas, como o fazem os elementos *TART* e *Het-A* em *Drosophila*. Esses dois elementos realizam, atualmente, uma função celular básica semelhante à da enzima telomerase. *Het-A* e *TART* têm inserção preferencial nas regiões teloméricas dos cromossomos e, desta forma, eles mantêm constante o tamanho do cromossomo, que durante o ciclo celular perde parte dessas regiões. Este é o

melhor exemplo onde um elemento de transposição realiza uma função vital para o genoma hospedeiro (Kidwell & Lisch, 1997).

Em uma revisão realizada por Capy *et al.* (2000) é exposta a relação entre a ativação dos elementos de transposição e estresse proporcionados por fatores ambientais, tal fenômeno foi identificado para vários elementos em várias espécies. A resposta aos sinais ambientais externos parece diferir entre diferentes populações e linhagens, e esta variação parece estar relacionada a um “background” genético. Alguns elementos possuem regiões em suas seqüências muito similares a seqüências de promotores de “hsps”, proteínas conhecidas pela sua resposta aos choques de temperatura. Os autores discutem que este pode ser um caso de domesticação dos elementos de transposição por parte do genoma hospedeiro, ou os elementos poderiam ter adquirido essas seqüências a partir dos genomas onde se encontravam.

Outra conseqüência em resposta aos “danos” proporcionados pelos elementos de transposição é a criação, por parte do genoma hospedeiro, de mecanismos que reduzem a mobilização destes elementos. Mecanismos como metilação, mutações e interferência por RNA podem ter surgido como uma resposta ao aumento do número de cópias dos elementos de transposição no genoma hospedeiro (Hurst & Werren, 2001; Castro & Carareto, 2004).

Estudos recentes realizados com o retroelemento *micropia* verificaram a produção de RNA antisenso em moscas do grupo *repleta* (Lankenau, Corces & Lankenau, 1994; Almeida & Carareto, 2004). Este evento corrobora a hipótese de que a produção de RNA antisenso pode estar atuando no controle da expressão dos transcritos completos do elemento *micropia* na linhagem germinativa do hospedeiro, caracterizando um processo de regulação por interferência de RNA expresso pelo próprio elemento.

Todos os estudos realizados com elementos de transposição demonstram a sua potencialidade na geração de variabilidade genética nos organismos hospedeiros. Portanto, para entender a dinâmica dessas “seqüências móveis” e seus possíveis efeitos na evolução faz-se necessário o levantamento de dados a respeito do número de cópias e localização genômica desses elementos em diferentes espécies e suas populações.

### 1.3 Classificação dos elementos de transposição

Desde a descoberta dos elementos de transposição, há mais de 50 anos atrás, esses elementos têm se mostrado presentes na maioria dos organismos já estudados. Eles compõem a maior parte das seqüências de DNA medianamente repetitivo do genoma de animais e plantas podendo apresentar desde poucas cópias no genoma até centenas delas. Por exemplo, é estimado que mais de 50% do genoma do milho é composto por elementos de transposição; em *Drosophila* é estimado que eles componham de 10 a 15% do genoma e no genoma humano calcula-se que representem 45% (revisão em Kidwell & Lisch, 1997; 2001).

Devido à grande diversidade de elementos de transposição existente nos diferentes genomas e às diferenças de seqüências nucleotídicas encontradas e, conseqüentemente, proteínas produzidas por esses elementos móveis, foi necessária a construção de uma classificação que facilitasse os estudos destas seqüências.

Existem dois mecanismos de transposição que resultam na mobilização dos elementos, os quais diferenciam suas classes existentes. Toda a classificação apresentada aqui é baseada na classificação proposta por Capy *et al.* (1998).

#### 1.3.1 Elementos de Classe I

Os elementos desta classe são conhecidos por Retrotransposons. Eles se movimentam através de um intermediário de RNA que é codificado para DNA por uma transcriptase reversa, produzida por eles mesmos, antes da sua nova inserção. Por sua vez, esta classe é subdividida em duas subclasses: os retrotransposons com LTRs (longas repetições terminais) diretas ou invertidas; e os sem LTRs (Capy *et al.*, 1998).

##### ***Retrotransposons com LTRs***

São elementos estruturalmente similares aos retrovírus. Possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5' e 3'. De uma maneira geral, estas repetições terminais flanqueiam uma região central que contém três módulos abertos de leitura conhecidos por ORFs (Open Reading Frames) (Figura 3). A seqüência das ORFs pode variar entre os elementos deste grupo. A primeira ORF refere-se ao

gene *gag* que produz uma poliproteína que é processada em três proteínas maduras: a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo. Essas três proteínas possuem similaridade aos componentes do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease (Pr), transcriptase reversa (TR), RNAseH e integrase (Int). A última ORF está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional: ela corresponde ao gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus.

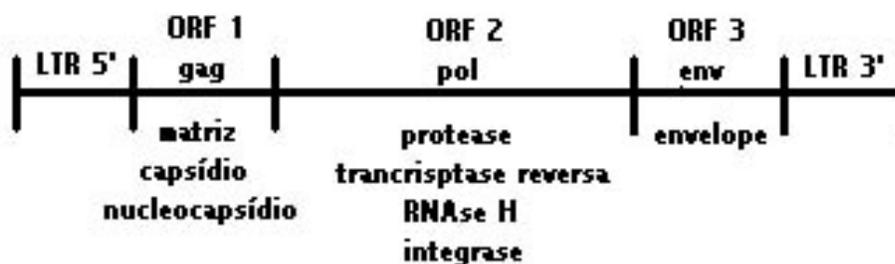


FIGURA 3: Esquema geral dos elementos de transposição de Classe I, baseado no elemento *gypsy*.

De acordo com a seqüência codificante dentro da segunda ORF, esta subclasse de retroelementos pode ser dividida em duas superfamílias: *Ty1-copia* com a seqüência 5' Pr-Int-TR-RNAseH 3', e *gypsy-Ty3* com a seqüência 5' Pr-TR-RNAseH-Int 3'. A superfamília *gypsy-Ty3* pode ser, ainda, dividida em duas famílias de acordo com a presença (família *gypsy*) ou ausência (família *Ty3*) do gene *env*.

Uma das principais questões proporcionadas pelos estudos de evolução dos elementos de transposição é a relação dos retroelementos, como o *gypsy*, que possuem gene *env* potencialmente funcional. Os retrotransposons com LTRs, mais especificamente os elementos da família *Ty3* possuem características similares às estruturas dos retrovírus, como as seqüências de LTRs, os genes *gag*, *pol*, e em alguns casos a presença do gene *env* incompleto e não funcional. Tem sido sugerido que os retrovírus se desenvolveram a partir dos retrotransposons com LTRs, pela aquisição de funcionalidade do gene *env*. Os trabalhos que sugerem estas idéias são baseados em similaridades das seqüências da enzima transcriptase reversa e de motivos das enzimas integrase e transposase de vários retroelementos

e retrovírus (revisão em Lerat & Capy, 1999). Apesar de ter sido sugerido a predominância da transição de retroelementos com LTRs para retrovírus, não podemos excluir a possível ocorrência do processo inverso.

Porém, análises filogenéticas das seqüências nucleotídicas da transcriptase reversa e integrase classificam os elementos desta família (também chamados de *gypsy-like*) como retrotransposons com LTR. Esta é a razão pela qual o elemento *gypsy* tem uma posição filogenética intermediária aos retrovírus e aos retroelementos com LTR (Capy *et al.* 1998).

Os retrotransposons são encontrados em organismos eucariotos. Constituem aproximadamente 2% do genoma de *Drosophila* e mais que 40% do genoma de certas plantas (revisões em Capy *et al.*, 1998 e Herédia, 2002).

### ***Retrotransposons sem LTRs***

Também chamados de Retroposons. Esta subclasse é dividida em duas superfamílias, LINEs (elementos nucleares dispersos longos) e SINEs (elementos nucleares dispersos curtos), a diferença entre essas duas superfamílias é a presença, nos LINEs, ou ausência, nos SINEs da enzima transcriptase reversa. Tanto os elementos LINEs quanto os SINEs têm sido encontrados em plantas, fungos e animais. Eles são encontrados em grande número de cópias nos genomas eucariotos.

A superfamília LINEs compreende elementos com tamanhos que variam entre 5 e 8kb, e possuem uma seqüência rica em adeninas no término 3', muito semelhantes às caudas poli A presente em RNAs mensageiros. Esses elementos possuem ORFs que codificam algumas enzimas necessárias para a transposição, como a transcriptase reversa e a RNaseH. Vários elementos LINEs apresentam especificidade por certos sítios de inserção, como os elementos *R1* e *R2* que têm preferência por uma região da seqüência do gene da subunidade maior do RNA ribossômico. São representantes desta superfamília os membros das famílias: *L1* em mamíferos, *I*, *F*, *TART*, *Het-A* e *jockey* em *Drosophila*, *Del2* e *Cin4* em plantas e *Tad* em fungos. Os elementos *Het-A* e *TART* presentes em *Drosophila* aparentemente possuem função na manutenção da integridade das regiões teloméricas dos cromossomos (revisão em Capy *et al.*, 1998).

Os elementos da superfamília dos SINEs possuem tamanhos menores que 500pb. Todos os elementos desta superfamília, com exceção dos elementos *Alu* de

primata e *B1* de roedores, são derivados de seqüências de RNA transportadores. Por não apresentarem seqüências correspondentes à transcriptase reversa, são geralmente dependentes dos LINEs para realizar sua transposição. Possuem seqüências homólogas e não homólogas a RNA transportador e uma região variável e rica em adeninas e timinas (revisão em Capy *et al.*, 1998). Lines e Sines constituem aproximadamente 48% do genoma humano.

### 1.3.2 Elementos de Classe II

A classe II constitui os elementos também chamados de Transposons. Essas seqüências se movimentam através de um intermediário de DNA por um mecanismo de excisão do sítio original e reinserção em outro sítio no genoma. Todos os elementos possuem repetições terminais invertidas (ITRs) que variam de 10 a 500pb. As repetições invertidas flanqueiam uma região central que codifica a enzima transposase nos elementos autônomos, que é necessária durante os eventos de transposição dos elementos desta classe (Figura 2). A estrutura gênica da região entre as ITRs pode apresentar modificações entre as diferentes famílias desta classe. Portanto, os transposons são caracterizados pela mobilização dos elementos através de um processo de excisão do sítio doador e reinserção em um outro sítio em qualquer posição no genoma hospedeiro, por um mecanismo não replicativo.

De acordo com as similaridades e a presença de alguns motivos das seqüências nucleotídicas dos elementos, a classe II de elementos de transposição é subdividida nas seguintes superfamílias: *mariner-Tc1*, *ISa*, *ISb*, *hAT*, *P*, *MuDR*, *CACTA* e *Tx*. Os elementos desta classe têm sido encontrados tanto em procariotos quanto em eucariotos (revisão em Capy *et al.*, 1998).



FIGURA 4: Esquema geral dos elementos de transposição de Classe II

Os elementos da classe II são freqüentemente utilizados em experimentos de transformação genética, como o elemento *P*, *minos*, *hobo*, *hermes* e *piggyBac*. Alguns desses elementos parecem não necessitar de fatores específicos do genoma

do hospedeiro para sua mobilização, apresentando um mecanismo de regulação mais simples que os retroelementos e se tornando extremamente úteis em experimentos de transgenia (revisão em O'Brochta *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Elementos de Classe III

Nesta classe estão agrupados os elementos que não se adequam às características dos elementos das duas classes anteriores; possuem características incomuns e mecanismos de transposição ainda desconhecidos.

A princípio, esta classe é dividida em duas superfamílias: *MITEs* (miniatura de elementos transponíveis com repetições invertidas), que possuem curtas repetições terminais e os elementos *Foldback*, com longas repetições terminais.

Os elementos *MITEs* possuem uma estrutura interna comparável com a dos elementos da classe II, mas o seu alto número de cópias no genoma e sua inserção preferencial em regiões flanqueadoras de genes os tipificam como elementos da classe I. Um exemplo é o elemento *Guest* desta superfamília que foi encontrado no fungo *Neurospora crassa* e se ainda estiver ativo, pode ser considerado o menor elemento transponível eucarioto conhecido, com 334pb (revisão em Capy *et al.*, 1998).

Os elementos da superfamília *Foldback* foram encontrados primeiramente em *Drosophila*, mas também são encontrados em outros organismos como o elemento *TU* em ouriço-do-mar e o *Tc4* em *Caenorhabditis elegans*. Eles possuem repetições terminais e invertidas (ITRs) (revisões em Capy *et al.*, 1998).

## 1.4 O retroelemento *micropia*

O elemento *micropia* pertence à classe I de elementos de transposição, e foi primeiramente encontrado nas alças dos cromossomos plumosos presentes no cromossomo Y de *D. hydei* durante o estágio de prófase da divisão meiótica dos espermatócitos primários (Hennig *et al.*, 1983; Huijser *et al.*, 1988). Estes trabalhos verificaram que uma seqüência extraída do cromossomo Y possuía similaridade com outras regiões do genoma de *Drosophila hydei*, e não existia diferença de intensidade de sinal em experimentos realizados com machos e fêmeas

separadamente. Posteriormente, concluíram que a seqüência analisada tinha similaridade com retrotransposons da família *copia*. O nome *micropia* vem da técnica empregada na sua descoberta (experimentos de microclonagem) e da sua similaridade com elementos *copia*.

Este elemento tem um tamanho de 5,5kb, dos quais cada uma das repetições terminais possui 500pb. Na sua extensão, o elemento *micropia* possui duas regiões abertas para leitura que codificam proteínas similares a proteínas de nucleocapsídeo, transcriptase reversa, integrase RNaseH e protease de retrovírus (Lankenau *et al.*, 1988; Huijser *et al.*, 1988).

Recentemente, Almeida & Carareto (2004) identificaram a existência de duas possíveis subfamílias do elemento *micropia* em espécies do grupo *repleta*, verificando que este elemento está sofrendo as modificações do “tempo de vida” em seu hospedeiro, ou seja, algumas espécies analisadas apresentam seqüências divergentes do elemento canônico. Este trabalho também amplia a distribuição do elemento *micropia* dentro do gênero *Drosophila*, que já foi descrito para o subgênero *Sophophora* (grupo *melanogaster*, grupo *willistoni* e grupo *saltans*) e subgênero *Drosophila* (grupo *immigrans*, grupo *funebri* e algumas espécies do grupo *repleta*) (Lankenau, 1993; Almeida, Castro & Carareto, 2001). Corroborando estudos anteriores (Castro, 2003; Lankenau, 1993; Lankenau, Corces & Lankenau, 1994), as autoras afirmam que o elemento *micropia* estava presente nas espécies de *Drosophila* antes mesmo da diversificação do gênero.

Almeida & Carareto (2004) ainda verificaram a presença de possíveis cópias exclusivas de machos nas espécies estudadas do grupo *repleta*, além de identificar a produção de RNA antisenso pelo elemento *micropia*, cuja presença pode estar participando do controle da expressão dos transcritos completos do elemento *micropia* (Lankenau, Corces & Lankenau, 1994; Almeida & Carareto, 2004).

## 1.5 O retroelemento *gypsy*

O retroelemento *gypsy* foi primeiramente encontrado em *Drosophila melanogaster* e relacionado com a geração de aberrações cromossômicas durante o desenvolvimento desta espécie (revisão em Herédia, 2002). O retroelemento possui

7,5kb de comprimento e longas repetições terminais (LTRs) com 482pb cada (Bayev *et al.*, 1984).

Seqüências homólogas ao elemento *gypsy* descrito para *D. melanogaster* estão amplamente distribuídas entre as espécies do gênero *Drosophila*. Esta distribuição corrobora a hipótese de que uma seqüência ancestral do elemento *gypsy* estava presente na família Drosophilidae antes da radiação *Drosophila*. Apesar desta constatação, recentemente foi identificada a existência de nove possíveis eventos de transmissão horizontal ocorridas durante a evolução do elemento *gypsy* na família Drosophilidae (Herédia, Loreto & Valente, 2004).

O elemento transponível *gypsy*, também conhecido por *mdg4*, faz parte da classe I de elementos transponíveis. A sua terceira região aberta para leitura (ORF) codifica uma proteína potencialmente funcional similar à proteína do envelope viral. Devido a este fato e por ter similaridades de seqüências nucleotídicas com os retroelementos, os elementos da família *gypsy* são considerados intermediários entre retrovírus e retroelementos com LTRs (Capy *et al.*, 1998).

Herédia, Loreto & Valente (2004) demonstraram que possivelmente seqüências de *gypsy* estiveram ativas há até bem pouco tempo nas espécies analisadas. Também propuseram a existência de nove eventos de transmissão horizontal deste elemento dentro do gênero *Drosophila* explicando, desta forma, o padrão complexo de distribuição filogenética apresentada pelo elemento *gypsy*. Um desses eventos deve ter ocorrido há 2,5 milhões de anos onde *D. neocardini* recebeu uma seqüência de *gypsy* a partir de *D. nebulosa* (Subgênero *Sophophora*, grupo *willistoni*).

O elemento *gypsy* é considerado o primeiro retrovírus descrito para insetos (Lerat & Capy, 1999). Os retrovírus possuem um efeito deletério no genoma hospedeiro devido às suas propriedades infectivas. Já os retroelementos dependem totalmente deste genoma para sua expansão e estão sujeitos ao controle do genoma hospedeiro e um exemplo é o gene *flamenco* em *D. melanogaster* que proporciona um certo controle sobre a movimentação do elemento *gypsy* no genoma desta espécie (Prud'Homme *et al.*, 1995).

## 2. Objetivos

Este trabalho tem o objetivo geral de contribuir com os estudos moleculares e evolutivos dos elementos de transposição dentro da família Drosophilidae e auxiliar no estudo de suas características como fonte geradora de variabilidade genética e também iniciar os estudos desses elementos no grupo *cardini* do gênero *Drosophila*. Assim, delineamos os diferentes objetivos específicos:

- 1) Verificar a presença ou ausência dos elementos de transposição *micropia* e *gypsy* no genoma de diferentes populações de *Drosophila cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e
- 2) Avaliar os prováveis número de cópias do elemento *micropia* no genoma destas populações.

## Capítulo 2

---

# **Distribuição dos elementos transponíveis *micropia* e *gypsy* em populações naturais de espécies do grupo *cardini* do gênero *Drosophila* do sul do Brasil**

Artigo redatado de acordo com as normas do periódico Genetica (Kluwer) à qual será submetido para publicação.

## Distribution of transposable elements *micropia* and *gypsy* in wild populations of *cardini* group of *Drosophila* from south Brazil

Cordeiro, J.<sup>1</sup>; Loreto, E. L. S.<sup>1</sup> & Valente, V. L. S.<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Dep. de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970. \* Author for correspondence

(Phone: +55-51-33166729; Fax: +55-51-33167311; e-mail: vera.gaietky@ufrgs.br)

*Key words:* *cardini* subgroup, *gypsy* retroelement, *micropia* retroelement, transposable elements.

### Abstract

The occurrence of sequences similar to two retrotransposons, *micropia* and *gypsy*, was studied in populations of three species of *Drosophila cardini* group from south Brazil. Two populations were studied from *D. cardinoides*, five from *D. neocardini* and nine from *D. polymorpha*. Under high Southern blot stringent conditions, we observed a variation from four to seven different insertion sites among the species for *micropia* probe, and some insertion site copy variability between the populations of the same species to this same probe. The PCR technique done to amplify a sequence that encodes the *micropia* element reverse transcriptase, showed that all populations studied present sequences with high similarity with the primers used. All *D. polymorpha* populations have sequences slightly smaller than the expected length of 812bp, suggesting nucleotide differences in this sequence between the species. Using the *gypsy* probe from *D. melanogaster*, we observed a variation from two to seven different sequences in the populations genome with homology to *gypsy*. Evaluation of GP81, a 485bp *env* gene sequence cloned from *D. polymorpha gypsy* element, was done in these populations showing a variation from one to ten sequences with homology to this clone among the populations. This paper is the first

study with transposable elements made with wild populations of different species of *cardini* group, and here we verify the wide distribution of the retroelement *micropia* among the species and their populations.

## Introduction

The *cardini* group is a member of the *Drosophila* subgenus. It is composed by 16 Neotropical species, eight of them were described as occurring in the Caribbean Islands and the remaining eight in the tropical America (Heed & Russel, 1971). *Drosophila cardinoides*, *D. neocardini* and *D. polymorpha* are members of the *cardini* subgroup and occur in the South America (Val, Vilela & Marques, 1981).

Genetic studies of the *cardini* group were made by Da Cunha (1949), Heed & Blake (1963), Martinez & Cordeiro (1970) and by Machado, De Toni & Hofmann (2001). These authors studied the vast polymorphism for pigmentation of the abdominal tergites, characteristic of *cardini* group members. Hollocher, Hatcher & Dyreson (2000a, b) showed that the pigmentation polymorphism expression in different areas of the abdomen in some *cardini* group species is under separate genetic control. The authors also showed that exist an accelerated rate of latitudinal change in pigmentation for the darkest species present in the Caribbean Island.

The chromosomal polymorphism for paracentric inversions in the polytene chromosomes of the *cardini* group was studied by Da Cunha, Brncic & Salzano, (1953), Heed & Russel (1971), Rohde & Valente (1996) and by De Toni, Herédia & Valente (2001). These authors propose that the amount of polymorphisms found in the *cardini* subgroup reflects the variability of ecological niches occupied by their populations. Among the species studied in this group, *D. polymorpha* presented the higher variability of chromosomal inversions: seven different segregating arrangements, being these inversions easily found in nature (De Toni, Herédia & Valente, 2001). Both polymorphisms, for abdominal pigmentation and for chromosomal inversions, are considered adaptive traits for the different variants carriers in the different niches occupied by those species populations.

Transposable elements are powerful genetic variability sources due to their property to move themselves inside the genomes, promoting changes in their

insertion sites neighboring regions, generating chromosomal rearrangements and genic deletions, among other host genome reconfigurations (Kidwell & Lisch, 2001).

Few studies were done screening the presence of transposable elements in species of the *cardini* subgroup: those of Capy, David & Hartl (1992), Daniels, Chovnick & Boussy (1990), Daniels et al. (1990), Herédia, Loreto & Valente (2004), Loreto et al. (1998). These studies verified the presence of the retrotransposon *gypsy* in some *cardini* group species but the *P*, *I*, *hobo* and *mariner* elements absence in these species group. Wilder & Hollocher (2001) verified the presence of *mini-me* elements in two *dunni* subgroup species genome of the *cardini* group, and correlated the existence of this transposable elements family with the microsatellites genesis in dipterans.

The existence of well succeeded polymorphisms in the *cardini* group species and the recent clear association reported between chromosomal inversions and transpositional activity in *Drosophila buzzatii* (Puig, Cáceres, & Ruiz, 2004) call attention for the putative intrinsic sources of genetic variability in the *cardini* group, specially considering the transposable elements potential. So, this report corresponds to an effort to identify transposable elements in *cardini* group species genomes and to detect their variability among different populations and species. In this study, we analyzed the presence and integrity of *micropia* and *gypsy* elements, and the copy numbers of *micropia* element in nine *D. polymorpha* populations, five *D. neocardini* populations and two *D. cardinoides* in two Southern Brazilian States, Santa Catarina and Rio Grande do Sul.

## **Materials and methods**

### *Populations of **Drosophila** Studied*

All the populations used are described in Tables 1 and 2, each listing includes the location of collection. Our research group members performed the collections recently, between 2000 and 2003, generating populations starting from few (2-3) wild females. All strains have been maintained in laboratory by mass crosses and reared

in corn flour culture medium (Marques et al., 1966), in a  $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  chamber, 60% r.h.

### *Southern blot analysis*

Seventy adult flies per sample were macerated in a 1.5ml microcentrifuge tube using liquid nitrogen; and the genomic DNA was extracted according to Jowett (1986) with slight modifications. DNA samples (7 $\mu\text{g}$ ) were digested with restriction enzymes *Bgl* II and *Hind* III from Invitrogen. The enzyme *Bgl* II has no cleavage site in *micropia* sequence from *D. hydei* and has two cleavage sites in *gypsy* sequence isolated from *D. melanogaster* (nucleotides 426 and 7413). The enzyme *Hind* III has one cleavage site in the nucleotide 2628 in *micropia* sequence (Figure 1). For positive signal it was used 5ng of each probe. The DNA fragments were then submitted to electrophoresis on 0.8% agarose gels and transferred to nylon membranes (Hybond N+®, Amersham Biosciences). The probes were labeled using the chemiluminescent hybridization system Gene Images® (Amersham Biosciences) according to manufacture's instructions. The membranes were hybridized at 60°C temperature with the addition of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  sonicated salmon sperm DNA (Invitrogen) in the prehybridization and hybridization solutions to guarantee the signals specificity. Each membrane was washed for 15 min at 60°C, once at 1XSSC and 0.1%SDS, and second time with 0.5XSSC and 0.05%SDS. For signals detection, it was used the Gene Images CDP-Star® detection module (Amersham Biosciences). In the figures here presented the positive signals were not shown.

### *The probes*

For *micropia* retroelement it was used as probe a 3.1Kb fragment obtained by *Eco*RI *dhMiF2* plasmid digestion that contains the *micropia* element isolated from *D. hydei* (NCBI accession number X13304) (Huijser et al., 1988). As probe for *gypsy* retroelement it was used a 6.9Kb pGGHS plasmid fragment obtained from *Bgl*II restriction enzyme digestion. This retroelement was cloned from *D. melanogaster* (NCBI accession number M12927) (Dorset et al., 1989). We also used as probe, a part of the third ORF of *gypsy* cloned from a lineage of *Drosophila polymorpha*

collected in 1997 at Morro da Lagoa da Conceição (NCBI accession number AF548161) in a pCR-TOPO plasmid (Herédia, Loreto & Valente, 2004). This clone, named GP81, has 485bp length corresponding to the 6026 to 6511 nucleotide positions at ORF 3, which includes the *env* gene. In this experiment, the fragment was removed from the plasmid by the *EcoRI* restriction enzyme. The restriction maps of the probes used in this study can be seen in Figure 1.

### *DNA amplifications*

Polymerase chain reactions (PCR) were performed in 25µl volumes using approximately 25ng of template DNA, 5pMol of each primer, 0.2mM of each dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> and 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen) in 1x Polymerase Buffer. Temperature cycling was performed with the following profile: an initial denaturation for 3min at 95°C, 35 cycles consisting of 1min denaturation at 95°C, 1min annealing at 64°C and 1min extension at 72°C were carried out. In the end of these 35 cycles, we applied a final extension for 5min at 72°C. The primers used (MIC1777 – 5' CTCCCCTTTTGCCAGTCCT 3' and MIC2570 – 5' TTGAGCTAGCGT CGGTGTG 3') anneal into *micropia* sequence that encodes part of the *micropia* reverse transcriptase, and they have a high annealing temperature that makes sure the annealing specificity. The amplified fragment has 812bp and corresponds to nucleotides from 1777 to 2589. They were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel. In this experiment we used one more population from *D. cardinoides* collected in Florianópolis downtown (Table 2). For positive signal, it was used the dhMiF2 plasmid amplification.

## **Results**

### *Insertion site numbers of micropia in cardini group*

Figure 2 shows the band numbers obtained after the 3.1kb *micropia* fragment hybridization when the genomic DNA is cleaved with the enzyme *BglII*, in the different *D. cardinoides*, *D. neocardini* and *D. polymorpha* populations. The three species

seem to have in their genomes, sequences with high similarity to the *D. hydei micropia* element producing strong signals in the blots, once we have used no more than five minutes of exposition of the blots. *Drosophila polymorpha* presents four to six bands; *D. neocardini* also presents four to six bands showing the strongest hybridization signals; and *D. cardinoides* presented four visible bands in the blots. In Figure 2 it is also possible to see the variability occurrence in the *micropia* insertion sites among the different populations, both in *D. polymorpha* and in *D. neocardini*. The band pattern generated in the genome of different *D. cardinoides* populations remained constant.

Using the restriction endonuclease *Hind*III (Figure 3) for which the element *micropia* has an internal site (Figure 1), the *D. polymorpha* populations presented the expected hybridization pattern, with two times more bands detectable, when compared with the Figure 2. This finding seems to indicate a certain nucleotide sequence conservation, since the data obtained are expected according to the element restriction map.

The data shown in both Figures 2 and 3 suggest that the sequences present in the genomic DNA from the populations analyzed have a high similarity with the *D. hydei micropia* probe utilized in the hybridization experiments. This is particularly true, considering that clear hybridization signals were obtained using only 1 min of exposition. It is also possible to observe that some *D. polymorpha* populations have band patterns different of the remaining studied populations of this species. This is the case of the populations from Centro de Instruções de Santa Maria (PCI), from Universidade Federal de Santa Catarina (PUF), Florianópolis downtown (PCE) and Morro da Lagoa da Conceição (PML) shown in Figure 2 that have similar banding patterns different from other populations. It is interesting to note that the Centro de Instruções de Santa Maria population (PCI) was collected 800Km far from those three other populations. The species *D. cardinoides* and *D. neocardini* present more homogeneous patterns among their populations, although some *D. neocardini* populations show some bands with less intense signal (Figure 2).

#### *Analysis of micropia fragment among the species and populations*

The Southern blot experiments show that the *micropia* element used as probe presents the better hybridization signals, indicating the high nucleotide similarity

between this probe and sequences present in all populations genome studied. In this case, we performed a fragment analysis of *micropia* element done by PCR technique to see the integrity of this element between these population.

The 17 populations tested here for the primers MIC1777 and MIC2570 show the presence of amplified fragment (Figure 4). The sequence amplified by these primers corresponds to the central part of the *micropia*'s reverse transcriptase domain.

This fragment was amplified in all populations, even using high specificity conditions as the 64°C annealing temperature, although the populations of *D. polymorpha* have a fragment approximately 700bp and *D. cardinoides* and *D. neocardini* populations show the presence of a fragment near to 800bp.

#### *Distribution of gypsy-like sequences among the species and populations*

According to Figure 1, the *D. melanogaster*'s *gypsy* retroelement sequence have restriction sites for the enzyme *Bgl*II only in the extremities (nucleotides 426 and 7413). If the cleavage sites of *Bgl*II have been conserved in the *gypsy*'s sequences present in the species genomes tested here, it would be possible to evaluate the integrity of these sequences in the populations. Analysis of the Figure 5 shows that all studied populations present sequences homologous to the retroelement *gypsy*.

There are differences between the species: *Drosophila cardinoides* presents from six to seven bands in the blots only with a three hour exposition; *D. neocardini* presents from four to five bands and *D. polymorpha* only one or two bands. *Drosophila polymorpha* presents bands with length of approximately 6.9kb, which can correspond to possible complete *gypsy* copies, but they are weak bands (Figure 5a). The same occurred with *D. cardinoides*, where the bands were still more faint (Figure 5b). *Drosophila neocardini* and *D. cardinoides* present bands higher and smaller than 6.9kb. In addition to the 6.9kb band, *Drosophila polymorpha* present also a higher band with 10 kb. Higher times of exposition (three hours or more) allowed the observation of other signals very weak (data not shown) demonstrating the possible sequence divergence present in this species. *Drosophila neocardini*, however, did not show more bands than those present in Figure 5b, even using higher exposition time in the blots. No population presented bands correspondent to sequences similar to from *D. melanogaster*'s *gypsy* element smaller than 3kb.

When hybridized with the *D. polymorpha* cloned fragment GP81 (Figure 6), the DNA of all *D. polymorpha* populations present a sole band higher than 10kb that might correspond to the same band showed in the Figure 5 in those populations. The *D. neocardini* populations present three bands with less intensity when compared with the signals detected in the *D. polymorpha* genome showed in Figure 6a. In Figure 6b, the *D. neocardini* populations present from nine to ten bands considering that the membranes exposition time was higher (over night) than that illustrated in Figure 6a. *Drosophila polymorpha* showed a very weak signal near the 6.9kb length when was used more time of blot's exposition (data not shown). *Drosophila neocardini* also present bands higher and smaller than 6.9kb, what suggests the presence of altered sequences similar to GP81 probe in its populations (Figure 6b). The comparison of this data with the ones from Figure 5 shows that *D. neocardini* presents better hybridizing signals when the *D. melanogaster's gypsy* element was used as probe.

The *D. cardinoides* populations genome present the most weak hybridization signals of all the species with three to four bands. We only observed signals for this species with over night exposition of the blots. Bands smaller than 6.9kb were also detected in *D. cardinoides*, suggesting the existence of deleted sequences with certain similarity with the element *gypsy*. Using the probe GP81, the smallest hybridizing band obtained was a 1kb band from *D. neocardini*.

## Discussion

The Southern blot technique using heterologous probe has been an extremely useful research tool for the evaluation of host genomic distribution and restriction sites conservation of transposable elements. Using such approach, our study is one of the pioneers in the presence evaluation of sequences homologous to retrotransposons in natural populations of *Drosophila* genus from *cardini* group.

Some studies looking for the transposable elements abundance were performed in *Drosophila* species, such as: the retroelements *412* (Aulard et al., 1995), *copia*, *mdg1*, *mdg3*, *gypsy* and others (Vieira et al., 1999), the transposons *P*, *I* and *hobo* element (Ronsseray, Lehmann & Anxolabéhère, 1989; Ruiz & Carareto,

2003a,b) in *Drosophila melanogaster* and *mariner* in species of the *D. melanogaster* group (Capy, David & Hartl, 1992). *Drosophila simulans* populations were screened for the presence of several transposons and retrotransposons like *1731*, *copia*, *gypsy*, *hobo*, *mariner* (Biémont et al., 1994; Vieira, Piganeau & Biémont, 2000) and *gypsy* retroelement (Loreto, Valente & Zaha, 1998); populations of *obscura* group species were tested for *gypsy*, *P*, *I*, *hobo*, and many other elements (de Frutos, Peterson & Kidwell, 1992); *D. buskii*, *D. bandeirantorum*, *D. immigrans*, *D. mercatorum*, *D. polymorpha*, *D. sturtevanti*, *D. willistoni* were screened for *gypsy* (Herédia, Loreto & Valente, 2004); *D. sturtevanti* and *D. willistoni* for *P* element (Silva & Kidwell, 2004), and some species of *repleta* group for *Gandalf* element (Marin & Fontdevila, 1995), various species from *Drosophila* and *Sophophora* subgenus for *hobo* element (Daniels, Chovnick & Boussy, 1990) among others studies with different *Drosophila* genus populations.

The present study shows that the retroelement *micropia* is more variable among the *cardini* group populations studied here than the retroelement *gypsy*, although in general, the hybridization band patterns were similar. Some *D. polymorpha* populations did not present certain bands and/or they were only detected as weak signals as shown in Figure 2, in comparison with other populations (Figures 2 and 3). Among the *D. neocardini* populations, the differences are concerned to the signal intensity in certain bands, whereas the two *D. cardinoides* populations analyzed show the same pattern (Figure 2). Perhaps different patterns could be detectable when more natural populations of this species will be available.

As *D. hydei's micropia* retroelement does not have sites of recognition for *BglII*, all the bands expected and visualized in the populations here studied are higher than 6kb, i.e. have length superior than 4.8kb that is the entire length of *micropia* retroelement from *D. hydei*. This finding suggests that *micropia* isolated from *D. hydei* has sequences with related similarity in the *cardini* group species and the bands indicates the number of *micropia* insertion site in the genome of these populations. The integrity of the sequences, however, need to be yet investigated, using other enzymes and performing the proper sequencing of this element in the *cardini* group species of *Drosophila*.

Trying to explain the difference detected in the *micropia* hybridization band numbers among the different *D. polymorpha* populations we hypothesized that: firstly, if the introduction of this retroelement in this species occurred recently, it could

generate the patterns found here. It is not an impossible hypothesis considering that *micropia* element encodes a full-length RNA sequence and antisense RNAs complementary to reverse transcriptase and RNase H, indicating that, at least transcriptionally, this element is active (Lankenau, Corces & Lankenau, 1994 and Almeida & Carareto, 2004).

The second and perhaps the more probable hypothesis, is that the retroelement *micropia* should be present in the genome of *D. polymorpha* since a very long time ago, and the lack of some bands in the blots indicate the loss of copies already existent in the genomes, following the idea of transposable elements life cycle proposed by Kidwell & Lisch (2001). The studies of Lankenau (1993), Lankenau, Corces & Lankenau (1994) and Almeida & Carareto (2004) corroborate the second hypothesis. The findings of those authors report the *micropia* occurrence in 50 species of the *Sophophora*, *Drosophila* and *Dorsilopha* subgenus supporting the vertical transmission idea of this retroelement among the *Drosophila* genus evolutionary history.

The hybridization band numbers identified for *micropia* in the *cardini* group species was relatively small compared with those found in the *repleta* group genome. In this group of flies there are 7 to 17 *micropia* copies among the species analyzed by Southern blot (Almeida & Carareto, 2004) and in *D. melanogaster* the copy number ranges between 16 and 32 (Lankenau, 1993). In the *cardini* group there are only four to six bands in *D. polymorpha*, four to six in *D. neocardini* and four bands in *D. cardinoides*. The variation presented here corresponds to the different populations of each species.

Almeida & Carareto (2004) also verified the occurrence of two *micropia* subfamilies in different *repleta* group species of *Drosophila* subgenus. The authors observed differences obtained by PCR and by Southern blot showing that only *D. spenceri* did not show any signal of antisense RNA hybridization even presenting nine copies of this element in its genome. Our data obtained by PCR shows that the nucleotide sequence from the primers used to amplify the *micropia* element is highly conserved among the species *D. cardinoides*, *D. neocardini* and *D. polymorpha*. But difference in size of *micropia* fragments amplified from these species still occur. This is suggested by the difference between the fragments length in the agarose gel (Figure 4). In this figure, *D. cardinoides* and *D. neocardini* have longer fragment that seems to be the expected ones, when compared with the *D. polymorpha* population

fragments. Experiments done to verify the expression of antisense RNA and the sequencing of these fragments could confirm this suspicion, and clarify if they correspond to different *micropia* subfamilies present in these species group, or only sequences with a large deletion.

Silva, Loreto & Clark (2004) proposed that the coexistence of different transposable element subfamilies in a host genome could be considered as a clue for the occurrence of independent invasions in the genome. As also did Herédia, Loreto & Valente (2004), however, we think that the explanation of an ancestral polymorphism cannot be discarded, if the sequence divergence from different subfamilies was compatible with the phylogenetic divergences expected in comparison with the sequences of subfamilies found in the other species.

Concerning the retroelement *gypsy*, studies like the ones of de Frutos, Peterson & Kidwell (1992), Herédia, Loreto & Valente (2004) showed homogeneity in the banding patterns obtained from different population of the same species. Our results appoint to the same conclusion in the natural populations of *D. cardinoides*, *D. neocardini* and *D. polymorpha*. The variation in the hybridizing band numbers found among same species populations in our sampling is mainly due to those bands with weak signals, probably more divergent in relation to the probe used.

*Drosophila neocardini* present bands more intensively labeled when its DNA was hybridized with *gypsy* sequence isolated from *D. melanogaster*. The band signal was less strong when the probe GP81 isolated from the *D. polymorpha* genome was used. This finding allow us to infer that the sequence present in *D. neocardini* is highly divergent when compared with the sequence of *D. polymorpha*, being more similar to that sequence present in the genome of *D. melanogaster*.

*Drosophila neocardini* also present the higher hybridization band number with *gypsy* probe than the other species, suggesting that this element was active until few time ago in this specie. According to Herédia, Loreto & Valente (2004), *D. neocardini* probably was involved in a horizontal transfer process of *gypsy* transposon, where this specie received a copy element from *D. nebulosa* (*willistoni* group, *Sophophora* subgenus). This process would have occurred around 2.5 million years ago. So, it is possible that the *gypsy* element has been present in the genome of the Drosophilidae family since before the differentiation of the two subgenus: *Sophophora* and *Drosophila* (around 40 to 62 Myr). Consequently, the time when the

event of the putative horizontal transfer occurred, is very recent, resulting in the high copy number detected in our analysis by Southern blot in *D. neocardini*.

The transposable element band numbers estimate in the genome of a species should be taken with caution, because it is dependent of the element restriction map conservation used as reference for the sequences investigated. Besides this, the high sequences divergence can abolish the detection of some bands, as shown in Figure 5a for *D. neocardini*, when the film was subject to 30 minutes of exposition. Under longer exposition (three hour), the weak bands, seen Figure 5b, were also detected.

Respect to *gypsy* we only found very faint bands probably correspondent to the expected length of 6.9kb in the *D. polymorpha* and *D. cardinoides* genomes (Figure 5). We can infer that exist few copies of this fragment in the genome of these species and they could represent active sequences. These sequences weren't found in the genome when it was used the probe GP81 (Figure 6), probably due to a very low number of copies in this length. Once using over time exposure it is possible verify that exists a slightly signal referent to 6.9kb (data not shown).

We also found hybridizing bands with lengths smaller than 6kb, probably correspondent to deleted *gypsy*-like sequences. The bands higher than 6.9kb hybridized with *gypsy* and present in all populations possibly are either sequences that lacked the recognition sites for the enzyme used, or can be sequences similar to the element *gypsy* that acquired great insertions that remained interspersed on its structure. All possibilities are due to internal modifications of sequences similar to *gypsy*, insertions and/or deletions, occurred along the *cardini* group evolutionary history. Lankenau et al. (1990) compared the *micropia* sequence from *D. hydei* and *D. melanogaster* and identified some insertions on these sequences; one of them was an entire *copia* element sequence.

We can conclude that the *cardini* group genome have high copy numbers of sequences with great insertions or sites deleted for the enzyme *Bgl* II (Figure 5a). The pattern for *gypsy* hybridization showed among the *cardini* group species is indicative of the element inactivation of these sequences. This is reflected by the bands with higher and smaller lengths strongly labeled. Similar results were found by Herédia, Loreto & Valente (2004) for populations of *D. polymorpha*, *D. immigrans*, *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. busckii* and by Bucheton (1995) in *D. melanogaster* populations from very distant localities.

A wide distribution of transposable elements in the genus *Drosophila* was well documented for retroelements as *412* (Hoogland, Vieira & Biéumont, 1997; Cizeron et al., 1998), *1731* (Montchamp-Moreau et al., 1993), *bilbo* (Vieira et al., 1999; Blesa, Gandía & Martínez-Sebastián, 2001), *copia* (Vieira et al., 1999; Stacey et al., 1986), *gypsy* (Vieira et al., 1999; Herédia, Loreto & Valente, 2004), *micropia* (Almeida & Carareto, 2004 and Lankenau, 1993), *blood*, *burdock*, *coral*, *flea*, *HMS beagle*, *opus*, *tirant*, and other retroelements (Sniegowski & Charlesworth, 1994; Vieira et al., 1999), *Oswaldo* (Labrador & Fontdevila, 1994), and other studies with retroelements. Our findings widen this scenario, contributing with information about the elements *micropia* and *gypsy* present in the genus *Drosophila*, first step to identify the strategies used by the host genomes to put invader DNAs under control.

### **Acknowledgements**

The authors thank Dr D. H. Lankenau (Huijser et al., 1988) for providing the dhiMF2 plasmid, Dr Dale Dorsett (Dorset et al., 1989) for providing the pGGHS plasmid and the research group members of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Thanks are due to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS by fellowships and grants.

Table 1. Populations of species of the *Drosophila cardini* group studied from Rio Grande do Sul State.

Species	Population	Localization	Coordinates
<i>Drosophila cardinoides</i>	CMS	Morro Santana	S 30° 04' W 51° 08'
<i>Drosophila polymorpha</i>	PCI	Centro de Instrução de Santa Maria	S 29° 32' W 53° 42'
	PMS	Morro Santana	S 30° 04' W 51° 08'
	P TU	Parque do Turvo	S 27° 20' W 53° 40'

Table 2. Populations of species of The *Drosophila cardini* group species studied from Santa Catarina State.

Species	Population	Location	Coordinates
<i>Drosophila cardinoides</i>	CUF	Universidade Federal de Santa Catarina	S 27° 36' W 48° 31'
	*CCE	Florianópolis downtown	S 27° 35' W 48° 33'
<i>Drosophila neocardini</i>	NAR	Arvoredo Island	S 27° 17' W 48° 21'
	NCE	Florianópolis downtown	S 27° 35' W 48° 33'
	NMC	Morro da Cruz	S 27° 35' W 48° 31'
	NUF	Universidade Federal de Santa Catarina	S 27° 36' W 48° 31'
	NJO	Joinville city	S 26° 17' W 49° 01'
<i>Drosophila polymorpha</i>	PCE	Florianópolis downtown	S 27° 35' W 48° 33'
	PMC	Morro da Cruz	S 27° 35' W 48° 31'
	PML	Morro da Lagoa da Conceição	S 27° 35' W 48° 28'
	PMA	Mangue do Itacorubi	S 27° 34' W 48° 31'
	PRE	Joaquina's beach	S 27° 38' W 48° 27'
	PUF	Universidade Federal de Santa Catarina	S 27° 36' W 48° 31'

\* Population used in the Polymerase Chain Reaction only.

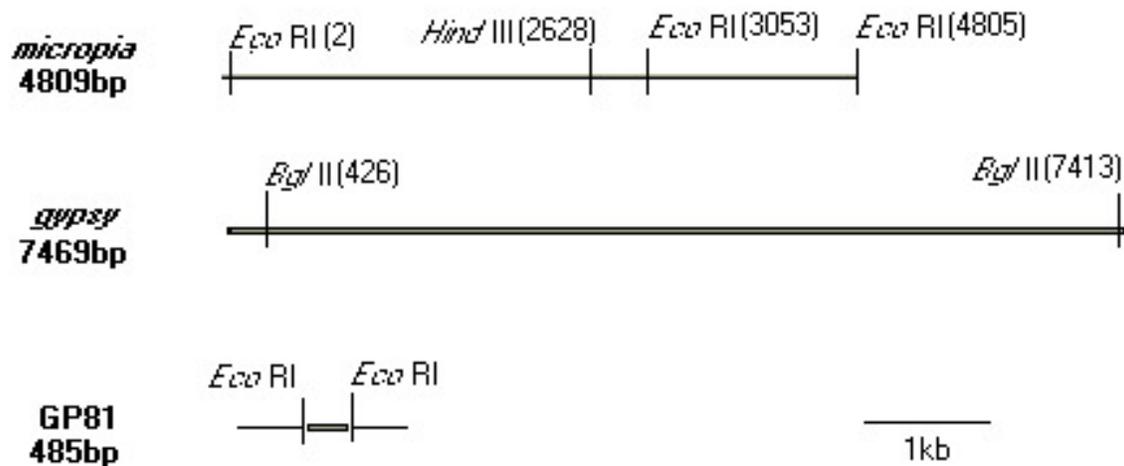


Figure 1: Maps of the probes with the indication of the restriction sites for the enzymes *Bgl* II, *Eco* RI and *Hind* III. Heavy lines indicate the transposable elements sequences. In parentheses are presented the nucleotide numbers of the restriction sites in the transposable elements. *Micropia* is referent to clone dhMiF2 from *D. hydei*, *gypsy* to clone pGGHS from *D. melanogaster* and GP81 is referent to the fragment of env *gypsy*'s gene isolated from *D. polymorpha*.

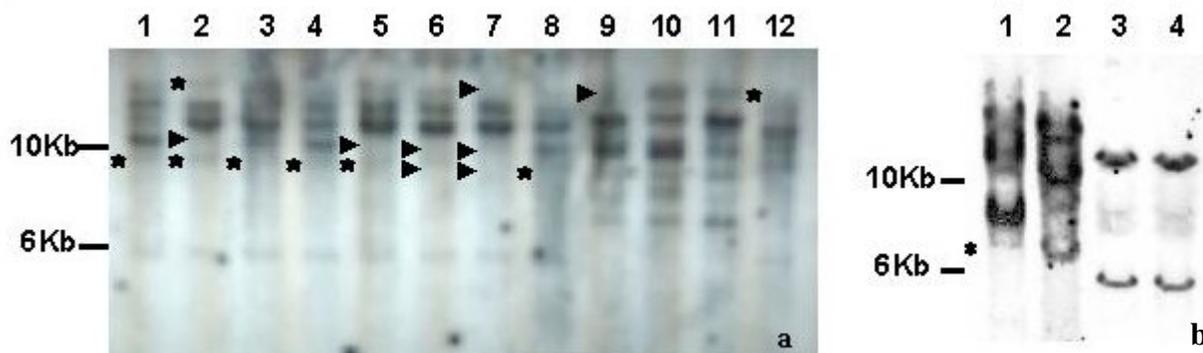


Figure 2: Southern blots from DNA of *cardini* group populations from South of Brazil. Genomic DNA was digested with *Bgl*II restriction enzyme and probed with the 3.1kb *Eco*RI *micropia* fragment from dhMiF2 plasmid. The populations are as follows: *Drosophila polymorpha*: a. 1-PTU, 2-PMS, 3-PCI, 4-PMC, 5-PUF, 6-PCE, 7-PML, 8-PRE and 12-PMA. *Drosophila neocardini*: a. 9-NCE, 10-NJO, 11-NAR, b. 1-NMC and 2-NUF. *Drosophila cardinoides*: b. 3-CUF, 4-CMS. The arrowheads shows the sites which lacks the hybridizing band, and the stars show the faint bands.

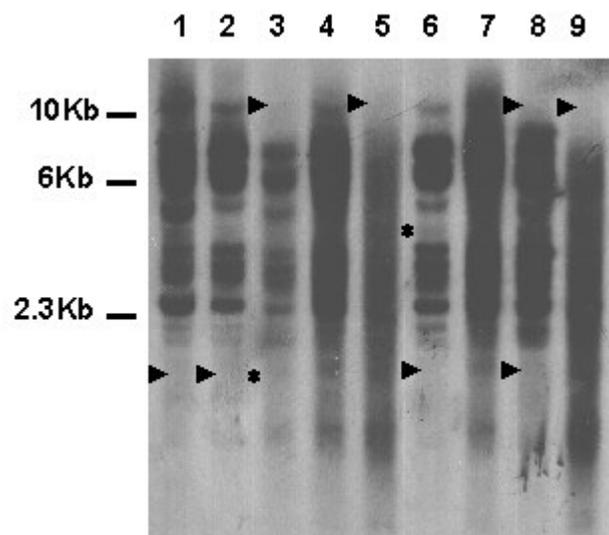


Figure 3: Southern blots from DNA of *Drosophila polymorpha* populations from South of Brazil. Genomic DNA was digested with *Hind* III restriction enzyme and probed with dhMiF2. The populations are as follows: 1-PTU, 2-PMS, 3-PCI, 4-PML, 5-PMC, 6-PUF, 7-PCE, 8-PMA, 9-PRE. The arrowheads show the sites which lacks the hybridizing band, and the stars show the faint bands.

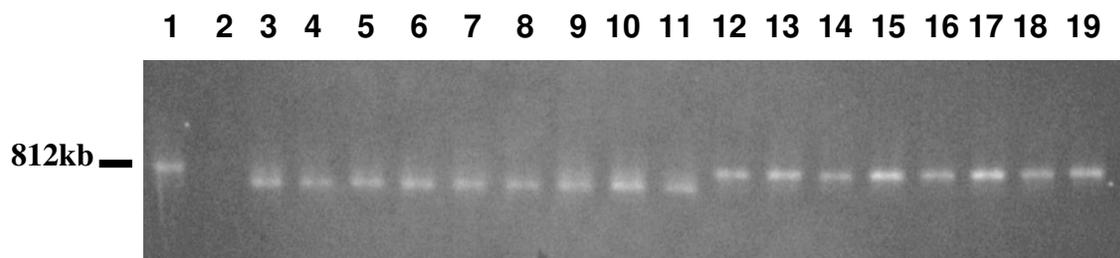


Figure 4: PCR products obtained with *micropia*-specific primers used as template genomic DNA from the following populations: *Drosophila polymorpha*: 3-PTU; 4-PMS; 5-PCI; 6-PCE; 7-PMA; 8-PMC; 9-PML; 10-PRE; 11-PUF; *Drosophila cardinoides*: 12-CMS; 13-CCE; 14-CUF; *Drosophila neocardini*: 15-NAR; 16-NCE; 17-NMC; 18-NJO and 19-NUF. Number 1 is the positive control amplifying 812pb from the dhMiF2 plasmid. Number 2 is the negative control.

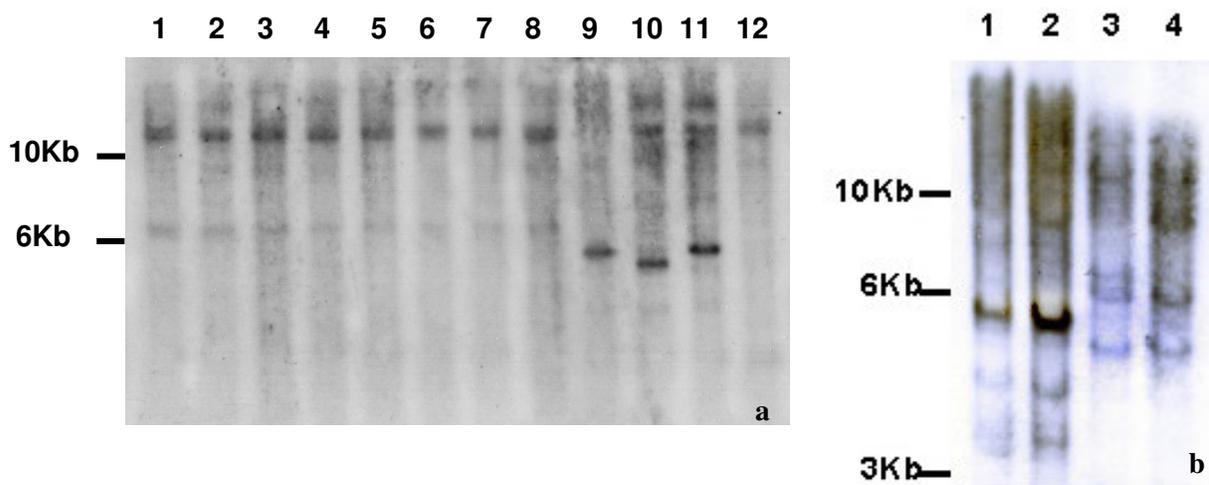


Figure 5: Southern blots of DNA from the *Drosophila cardini* group populations from South of Brazil. Genomic DNA was digested with *Bgl*II restriction enzyme and probed with a 6.9kb *Bgl*II *gypsy* fragment from pGGHS plasmid. The populations are as follows: *Drosophila polymorpha*: a. 1-PTU, 2-PMS, 3-PCI, 4-PMC, 5-PUF, 6-PCE, 7-PML, 8-PRE and 12-PMA. *Drosophila neocardini*: a. 9-NCE, 10-NJO, 11-NAR, b. 1-NMC and 2-NUF. *Drosophila cardinoides*: b. 3-CUF, 4-CMS.

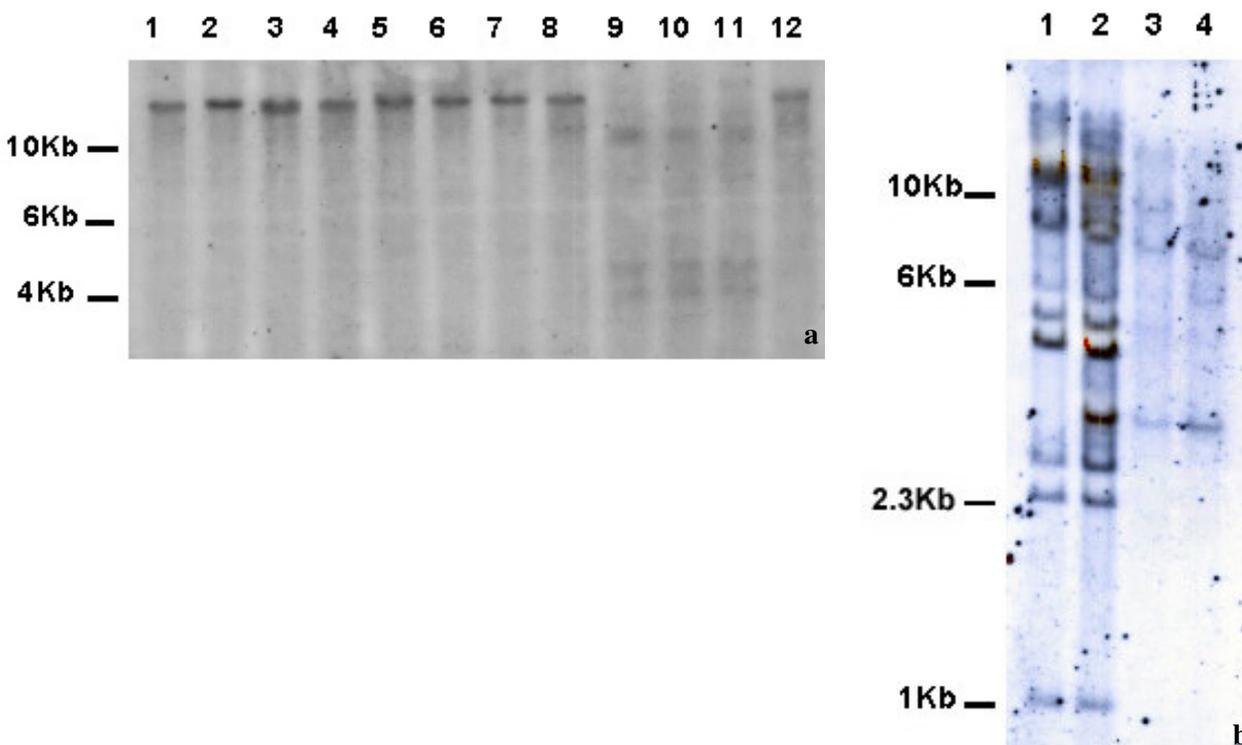


Figure 6: Southern blots from DNA of *Drosophila cardini* group populations from South of Brazil. Genomic DNA was digested with *Bgl*II restriction enzyme and probed with the 485bp *gypsy* clone. The populations are as follows: *Drosophila polymorpha*: a. 1-PTU, 2-PMS, 3-PCI, 4-PMC, 5-PUF, 6-PCE, 7-PML, 8-PRE and 12-PMA. *Drosophila neocardini*: a. 9-NCE, 10-NJO, 11-NAR, b. 1-NMC and 2-NUF. *Drosophila cardinoides*: b. 3-CUF, 4-CMS.

## References

- Almeida, L. M. & C. M. A. Carareto, 2004. Identification of two subfamilies of *micropia* transposable element in species of the *repleta* group of *Drosophila*. *Genetica* 121: 155-164.
- Aulard, S., E. Lemeunier, C. Hoogland, N. Chaminade, J. F. Brookfield & C. Biémont, 1995. Chromosomal distribution and population dynamics of the 412 retrotransposon in natural population of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 103: 693-699.
- Biémont, C. & G. Cizeron, 1999. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. *Genetica* 105: 43-62.
- Biémont, C., F. Lemeunier, M. P. G. Guerreiro, J. F. Brookfield, C. Gautier, S. Aulard & E. G. Pasyukova, 1994. Population dynamics of the *copia*, *mdg1*, *mdg3*, *gypsy* e *P* transposable elements in natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 63: 197-212.
- Blesa, B., M. Gandía, & M. J. Martínez-Sebastián, 2001. Distribution of the *bilbo* non-LTR retrotransposon in Drosophilidae and its evolution in the *Drosophila obscura* species group. *Mol. Biol. Evol.* 18: 585-592.
- Bucheton, A., 1995. The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends Genet.* 11: 349-353.
- Capy, P., J. R. David & D. L. Hartl, 1992. Evolution of the transposable element *mariner* in the *Drosophila melanogaster* species group. *Genetica* 86: 37-46.
- Cizeron, G., F. Lemeunier, C. Loevenbruck, A. Brehm, & C. Biémont, 1998. Distribution of the retrotransposable element 412 in *Drosophila* species. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1589-1599.

- Da Cunha, A. B., 1949. Genetic analysis of the polymorphism of color pattern in *Drosophila polymorpha*. *Evolution* 3 (3): 239-251.
- Da Cunha, A. B., D. Brncic & F. M. Salzano, 1953. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. *Heredity* 2 (7): 193–202.
- Daniels, S. B., A. Chovnick & I. A. Boussy, 1990. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 7 (6): 589-606.
- Daniels, S. B., K. R. Peterson, L. D. Strausbaugh, M. G. Kidwell & A. Chovnick, 1990. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* 124: 339-355.
- De Frutos, R., K. R. Peterson & M. G. Kidwell, 1992. Distribution of *Drosophila melanogaster* transposable element sequences in species of the *obscura* group. *Chromosoma* 101: 293-300.
- De Toni, D. C., F. O. Herédia & V. L. S. Valente, 2001. Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest remnants of continental and insular environments in the State of Santa Catarina, Brazil. *Caryologia* 4 (54): 329–337.
- Dorsett, D., G. A. Viglianti, B. J. Rutledge & M. Meselson, 1989. Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and suppressor genes in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 3: 454–468.
- Heed, W. B. & P. R. Blake, 1963. A new color allele at the locus of *Drosophila polymorpha* from northern south America. *Genetics* (2): 217-234.
- Heed, W. B. & J. S. Russel, 1971. Phylogeny and population structure in island and continental species of the *cardini* group of *Drosophila* studied by inversion analysis. *The University of Texas Publications* 7103: 91–130.

- Herédia, F., E. L. S. Loreto & V. L. S. Valente, 2004. Complex evolution of *gypsy* in drosophilid species. *Mol. Biol. Evol.* 21 (10): 1-12.
- Hollocher, H., J. L. Hatcher, & E. G. Dyreson, 2000a. Evolution of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. *Evolution* 54 (6) 2046-2056.
- Hollocher, H., J. L. Hatcher, & E. G. Dyreson, 2000b. Genetic and developmental analysis of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. *Evolution* 54 (6) 2057-2071.
- Hoogland C., C. Vieira & C. Biémont, 1997. Chromosomal distribution of the 412 retrotransposon in natural populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* 79: 128-134.
- Huijser, P., C. Kirchhoff, D. H. Lankenau, & W. Hennig, 1988. Retrotransposon-like sequences are expressed in Y chromosomal lampbrush loops of *Drosophila hydei*. *J. Mol. Biol.* 203: 689-697.
- Jowett, T., 1986. Preparation of nucleic acids. pp. 275-286 in *Drosophila: a practical approach*, edited by D. B. Roberts. IRL Press, Washington, D.C.
- Kidwell, M. G. & D. R. Lisch, 2001. Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55: 1-24.
- Labrador, M. & A. Fontdevila, 1994. High transposition rates of *Oswaldo*, a new *Drosophila buzzatii* retrotransposon. *Mol. Gen. Genet.* 245: 661-674.
- Lankenau, D. H., 1993. The retrotransposon family *micropia* in *Drosophila* species, pp. 232-241 in *Transposable Elements and Evolution*, edited by J. McDonald. Kluwer Publishers, Amsterdam.

- Lankenau, D. H., P. Huijser, E. Jansen, H. Miedema & W. Hennig, 1990. DNA sequence comparison of *microopia* transposable elements from *Drosophila hydei* and *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 99: 111-117.
- Lankenau, S., G. V. Corces, & D. H. Lankenau, 1994. The *Drosophila microopia* retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol. Biol. Evol.* 17 (10): 1542-1557.
- Loreto, E. L. S., L. Basso da Silva, A. Zaha & V. L. S. Valente, 1998. Distribution of transposable elements in Neotropical species of *Drosophila*. *Genetica* 101: 153–165.
- Loreto, E. L. S., V. L. S. Valente & A. Zaha, 1998. Transposable elements in South American populations of *Drosophila simulans*. *Genet. Sel. Evol.* 30: 171-180.
- Machado, M. X., D. C. De Toni & P. R. P. Hofmann, 2001. Abdominal pigmentation polymorphism of *Drosophila polymorpha* (Dobzhansky and Pavan, 1943) collected on Ilha de Santa Catarina and neighboring island. *Biotemas* 14 (1): 87-107.
- Marín, I. & A. Fontdevila, 1995. Characterization of *Gandalf*, a new inverted repeat transposable element of *Drosophila koepferae*. *Mol. Gen. Genet.* 248 (4): 423-433.
- Marques, E. K., M. Napp, W. Winge & A. R. Cordeiro, 1966. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *D.I.S.* 41: 147.
- Martinez, M. N. & A. R. Cordeiro, 1970. Modifiers of color pattern genes in *Drosophila polymorpha*. *Genetics* 64: 573–587.
- Montchamp-Moreau, C., M. Ronsseray, M. Jacques, M. Lehmann & D. Anxolabéhère, 1993. Distribution and conservation of sequences homologous to the 1731 retrotransposon in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 10: 791-803.

- Puig, M., M. Cáceres & A. Ruiz, 2004. Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. PNAS 101 (24): 9013-9018.
- Rohde, C. & V. L. S. Valente, 1996. Cytological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* and *Drosophila cardinoides*. Braz. J. Genet. 19: 27–32.
- Ronsseray, S., M. Lehmann & D. Anxolabéhère, 1989. Copy number and distribution of P and I mobile elements in *Drosophila melanogaster* populations. Chromosoma 98: 207-214.
- Ruiz, M, T. & C. M. A. Carareto, 2003a. Characterization of *hobo* element copy number and integrity in Brazilian populations of *Drosophila melanogaster*. Hereditas 138 (2): 154-157.
- Ruiz, M, T. & C. M. A. Carareto, 2003b. Copy number of P elements, KP/full-sized P element ratio and their relationships with environmental factor in Brazilian *Drosophila melanogaster* populations. Heredity: 91 (6): 570-576.
- Silva, J. C., E. L. S. Loreto & J. B. Clark, 2004. Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. Curr. Issues Mol. Biol. 6: 57-72.
- Silva, J. C. & M. G. Kidwell, 2004. Evolution of P elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. Genetics 168: 1323-1335.
- Sniegowski, P. D. & B. Charlesworth, 1994. Transposable element numbers in cosmopolitan inversions from a natural population of *Drosophila melanogaster*. Genetics 137: 815-827.
- Stacey, S. N., R. A. Lansman, H. W. Brock, & T. A. Grigliatti, 1986. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 3: 522-534.

- Val, F. C., C. R. Vilela & M. D. Marques, 1981. Drosophilidae of the Neotropical region, pp. 123–168 in *The Genetics and Biology of Drosophila*. 3a, edited by M. Ashburner, H. L. Carson, and J. N. Thompson Jr. Academic Press, London.
- Vieira, C., D. Lepetit, S. Dumont & C. Biémont, 1999. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. *Mol. Biol. Evol.* 16 (9): 1251-1255.
- Vieira, C., G. Piganeau & C. Biémont, 2000. High copy number of multiple transposable element families in Australian population of *Drosophila simulans*. *Genet. Res.* 76: 117-119.
- Wilder, J. A. & H. Hollocher. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Mol. Biol. Evol.* 18 (3): 384-392.

## **CAPÍTULO 3**

---

# **CONCLUSÕES**

Com a finalização deste trabalho podemos concluir que:

Para o retroelemento *micropia* :

1. É observado um padrão de hibridação variável entre as espécies *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* e entre as populações dessas espécies;
2. Este elemento provavelmente está presente há muito tempo no genoma das espécies do grupo *cardini* aqui estudadas onde o baixo número de sinais de hibridação e a ausência de algumas bandas nos blots estaria indicando o avançado tempo de vida com a conseqüente perda de seqüências uma vez existentes no genoma dessas espécies;
3. É observada a conservação do sítio de restrição da enzima *Hind* III usada na técnica de Southern blot e a alta especificidade dos “primers” utilizados na técnica de PCR, possivelmente indicando a existência de seqüências altamente similares a *micropia* isoladas de *D. hydei*;
4. A existência de cópias deste elemento no genoma de todas as populações de *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* corrobora a hipótese de transmissão vertical deste retroelemento durante a evolução das espécies do gênero *Drosophila*;

Para o retroelemento *gypsy*:

1. O padrão de bandas apresentado pelas populações de *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* apresentam homogeneidade entre as espécies;

2. A homogeneidade dos sinais de hibridação apresentada pelas populações de *D. cardinoides*, *D. neocardini* e *D. polymorpha* indica que o elemento *gypsy* apresenta pouca diferença entre suas cópias nestas populações;
3. As populações de *D. neocardini* parecem ter seqüências com maior similaridade ao elemento *gypsy* isolado de *D. melanogaster*;
4. Seqüências semelhantes ao elemento *gypsy* isolado de *D. melanogaster* com tamanho de 6,9 kb parecem existir no genoma das populações de *D. cardinoides* e *D. polymorpha*, mas o sinal fraco apresentado provavelmente indica a baixa similaridade das seqüências ou o baixo número de cópias existente nesses genomas;
5. As populações aqui testadas, principalmente as de *D. polymorpha*, possuem seqüências similares a *gypsy* que possivelmente apresentam grandes inserções em suas seqüências ou apresentam a ausência do sítio de restrição para a enzima *Bgl* II potencializando a inativação de cópias deste elemento nessas populações;

## **CAPÍTULO 4**

---

# **PERSPECTIVAS**

Ao fim desta etapa verificamos o grande potencial de estudos que podem ser feitos dando continuidade a este trabalho. Através das conclusões obtidas percebemos a necessidade de expandirmos nossas análises através do uso de outras técnicas.

Portanto, indo em busca de respostas para as dúvidas que levantamos quanto ao fragmento amplificado por PCR do elemento *micropia* para *D. polymorpha*, a qual não pôde ser respondida pelas metodologias utilizadas, pretendemos realizar a clonagem das seqüências do elemento *micropia* obtidas por PCR das populações analisadas e posteriormente seqüenciá-las. Com isso, poderemos caracterizá-las e compará-las detectando as diferenças apresentadas pelos fragmentos amplificados e verificar possíveis semelhanças com as seqüências já descritas nas diferentes espécies onde este elemento já foi estudado.

Também pretendemos dar continuidade aos estudos do elemento *gypsy* no grupo *cardini*, realizando mais análises após o isolamento de seqüências similares ao elemento *gypsy* e posterior seqüenciamento. Isto nos esclarecerá sobre a base das diferenças no padrão de bandas de hibridação obtido para as três espécies aqui estudadas, e principalmente para *D. neocardini* que apresentou padrões diferentes entre suas cinco populações.

Uma das idéias iniciais deste trabalho era a verificação da concordância entre o número de cópias dos elementos de transposição *gypsy* e *micropia* inferidos nos experimentos de PCR e Southern Blot, com seus sítios de inserção nos cromossomos politênicos das três espécies, por hibridação *in situ*. Com isso, pretendíamos também analisar a provável existência de variações ou preferência por sítios de inserção nas diferentes populações. Mas no desenvolver do estudo encontramos vários empecilhos, entre eles o tempo dispendido no ajuste da técnica de hibridação *in situ* às nossas espécies. Juntamente com a urgência de obtenção de dados para o término desta etapa de nossa formação, nos forçamos a postergar

este tipo de análise, que é minuciosa e demorada. Porém, esta também é uma das metodologias que pretendemos desenvolver para dar continuidade a este trabalho.

Outra de nossas pretensões é ampliar o número de espécies do grupo *cardini* a serem investigadas e o número de elementos de transposição, tanto pela técnica de seqüenciamento quanto por hibridação *in situ*.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## Referências Bibliográficas

- Almeida, L. M. & Carareto, C. M. A. Identification of two subfamilies of *micropia* transposable element in species of the *repleta* group of *Drosophila*. **Genetica**, n. 121, p. 155-164. 2004.
- Almeida, L. M.; Castro, J. P. & Carareto, C. M. A. *Micropia* transposable element occurrence in *Drosophila* species of the *saltans* group. **D. I. S.**, n. 84, p. 114-117. 2001.
- Ashburner, M. ***Drosophila: a laboratory handbook***. New York: Cold Spring Harbor. Laboratory Press, New York. 1989, 1331p.
- Aulard, S.; Lemeunier, E.; Hoogland, C.; Chaminade, N.; Brookfield, J. F. & Biémont, C. Chromosomal distribution and population dynamics of the *412* retrotransposon in natural population of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, n. 103, p. 693-699. 1995.
- Bayev, A. A.; Lyubomirskaya, N. V.; Dzhumagaliev, E. B.; Ananiev, E. V.; Amiantova, I. G. & Ilyin, Y. V. Structural organization of transposable element *mdg4* from *Drosophila melanogaster* and a nucleotide sequence of its long terminal repeats. **Nucleic Acids Res.**, n. 12, p. 3707-3723. 1984.
- Biémont, C. & Cizeron, G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. **Genetica**, n. 105, p. 43-62. 1999.
- Biémont, C.; Lemeunier, F.; Guerreiro, M. P. G.; Brookfield, J. F. ; Gautier, C.; Aulard S. & Pasyukova, E. G. Population dynamics of the *copia*, *mdg1*, *mdg3*, *gypsy* e *P* transposable elements in natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Res.**, n. 63, p. 197-212. 1994.
- Blesa, B.; Gandía, M. & Martínez-Sebastián, M. J. Distribution of the *bilbo* non-LTR retrotransposon in Drosophilidae and its evolution in the *Drosophila obscura* species group. **Mol. Biol. Evol.**, n. 18, p. 585-592. 2001.

Bucheton, A. The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. **Trends Genet.**, n. 11, p. 349-353. 1995.

Cáceres, M.; Puig, M. & Ruiz, A. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions. **Genome Res.**, v. 8, n. 11, p. 1321–1322. 2001.

Cáceres, M.; Ranz, J. M.; Barbadilla, A.; Long, M. & Ruiz, A. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. **Science**, n. 285, p. 415–418. 1999.

Castro, J. P. & Carareto, C. M. A. *Drosophila melanogaster* P transposable elements: mechanisms of transposition and regulation. **Genetica**, n. 121, p. 107-118. 2004.

Capy, P.; Anxolabéhère, D. & Langin, T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? **Trends Genet.**, n. 10, p. 7–12. 1994.

Capy, P.; Bazin, C.; Higuët, D. & Langin, T. **Dynamics and evolution of transposable elements**. Austin, Texas: Landes Bioscience. 1998, 197p.

Capy, P., David J. R. & Hartl, D. L. Evolution of the transposable element *mariner* in the *Drosophila melanogaster* species group. **Genetica**, n. 86, p. 37-46. 1992.

Capy, P.; Gasperi, G.; Biémont, C. & Bazin, C. **Stress and transposable element: co-evolution or useful parasites?** Heredity, n. 85, p. 101-106. 2000.

Casals, F.; Cáceres, M. & Ruiz, A. The *Foldback*-like transposon *Galileo* is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 5, n. 20, p. 674–685. 2003.

Cizeron, G.; Lemeunier, F.; Loevenbruck, C.; Brehm, A. & Biémont, C. Distribution of the retrotransposable element *412* in *Drosophila* species. **Mol. Biol. Evol.**, n. 15, p. 1589-1599. 1998.

Colon-Parrilla, W. V. & Perez-Chiesa, I. Ethanol tolerance and alcohol dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) activity in species of the *cardini* group of *Drosophila*. **Biochemical Genetics**, v. 37, n. 314, p. 95-107. 1999.

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.

Da Cunha, A. B. Genetic analysis of the polymorphism of color pattern in *Drosophila polymorpha*. **Evolution**, v. 3, n. 3, p. 239-251. 1949.

Da Cunha, A. B. A further analysis of the polymorphism of *Drosophila polymorpha*. **Nature**, n. 171, p. 877. 1953.

Da Cunha, A. B.; Burla, H. & Dobzhansky, T. Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. **Evolution**, n. 4, p. 212-235. 1950.

Da Cunha, A. B.; Brncic, D. & Salzano, F. M. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain South American species of *Drosophila*. **Heredity**, v. 2, n. 7, p. 193–202. 1953.

Da Cunha, A. B.; Dobzhansky, T.; Pavlovsky, O. & Spassky, B. Genetics of natural populations. XXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism. In: *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. **Evolution**, n. 13, p. 389-404. 1959.

Daniels, S. B.; Chovnick, A. & Boussy, I. A. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, n. 6, p. 589-606. 1990.

Daniels, S. B.; Peterson, K. R.; Strausbaugh, L. D.; Kidwell, M. G. & Chovnick, A. Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, n. 124, p. 339-355. 1990

De Frutos, R., Peterson K. R. & Kidwell, M. G. Distribution of *Drosophila melanogaster* transposable element sequences in species of the *obscura* group. **Chromosoma**, n. 101, p. 293-300. 1992.

De Toni, D. C. **Estudo de comunidades de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) em regiões de Mata Atlântica do continente e de ilhas de Santa Catarina e variabilidade cromossômica de *D. polymorpha***. 167p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 1998.

\_\_\_\_\_. **Estudo da variabilidade genética e ecológica de comunidades e *Drosophila* em regiões de Mata Atlântica de ilhas e do continente de Santa Catarina**. 152p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 2002.

De Toni, D.C.; Beuren Araujo, C.; Morales, N. B. & Valente, V.L.S. Reference photomap of the salivary gland polytene chromosomes of *Drosophila neocardini* (Streisinger, 1946). **D. I. S.**, n. 84, p. 88-91. 2001.

De Toni, D. C.; Herédia, F. O. & Valente, V. L. S. Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest remnants of continental and insular environments in the State of Santa Catarina, Brazil. **Caryologia**, v. 4, n. 54, p. 329–337. 2001.

De Toni, D. C. & Hofmann, P. R. P. Preliminary taxonomic survey of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) at Morro da Lagoa da Conceição, Santa Catarina Island, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 3, n. 55, p. 347-350. 1994

Dobzhansky, T. & Pavan, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Bolm Fac. Filos. Cienc. S. Paulo**, v. 36, n. 4, p. 7-72. 1943.

Dorsett, D.; Viglianti G. A.; Rutledge, B. J. & Meselson, M. Alteration of *hsp82* gene expression by the *gypsy* transposon and supressor genes in *Drosophila melanogaster*. **Genes & Development**, v. 3, p. 454–468. 1989.

Frydenberg, O. Two new species from Peru (Diptera: Drosophilidae). **D. I. S.**, n. 30, p. 115. 1956.

Goñi, B.; Martinez, M. E & Daguer, P. Studies of two *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) communities from urban Montevideo, Uruguay. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 1, n. 41, p. 89-93. 1997.

Gottschalk, M. S. **Influência da urbanização sobre assembléias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil**. 111p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 2004.

Heed, W. B. Genetic characteristics of island populations. **The University of Texas Publications**, n. 6205, p. 173–206. 1962.

\_\_\_\_\_. Density and distribution of *Drosophila polymorpha* and its color alleles in South America. **Evolution**, n. 17, p. 502–518. 1963.

Heed, W. B. & Blake, P. R. A new color allele at the locus of *Drosophila polymorpha* from northern south America. **Genetics**, v. 2, n. 48, p. 217-234. 1963.

Heed, W. B. & Krishnamurthy, N. B. Genetic studies on the *cardini* group of *Drosophila* in the West Indies. **The University of Texas Publications**, n. 5914, p. 155–178. 1959.

Heed, W. B. & Russel, J. S. Phylogeny and population structure in island and continental species of the *cardini* group of *Drosophila* studied by inversion analysis. **The University of Texas Publications**, n. 7103, p. 91–130. 1971.

Heed, W.B. & Wheeler, M.R. Thirteen new species in the genus *Drosophila* from the neotropical region. **Univ. Texas Publs.**, n. 5721, p. 17-38. 1957.

Hennig, W.; Huijser, P.; Vogt, P.; Jackle, H. & Edstrom, J-E. Molecular cloning of microdissected lampbrush loop DNA sequences of *Drosophila hydei*. **The EMBO Journal**, v. 2, n.10, p. 1746-1983. 1983.

Herédia, F. **Evolução do retroelemento *gypsy* em espécies de *Drosophila* e em *Zaprionus indianus***: uma abordagem filogenética. 188f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 2002.

Herédia, F.; Loreto, E. L. S. & Valente, V. L. S. Complex evolution of *gypsy* in drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, n. 10, p. 1-12. 2004.

Hollocher, H.; Hatcher, J. L. & Dyreson, E. G. Evolution of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2046-2056. 2000a.

\_\_\_\_\_. Genetic and developmental analysis of abdominal pigmentation differences across species in the *Drosophila dunni* subgroup. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2057-2071. 2000b.

Hoogland C.; Vieira C. & Biémont, C. Chromosomal distribution of the 412 retrotransposon in natural populations of *Drosophila simulans*. **Heredity** n. 79, p. 128-134. 1997.

Huijser, P.; Kirchhoff, C.; Lankenau, D. H. & Hennig, W. Retrotransposon-like sequences are expressed in Y chromosomal lampbrush loops of *Drosophila hydei*. **J. Mol. Biol.**, n. 203, p. 689-697. 1988.

Hurst, G. D. D. & Schilthuizen, M. Selfish genetic elements and speciation. **Heredity**, n. 80, p. 2-8, 1998.

Hurst, G. D. D. & Werren, J. H. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. **Nature Reviews**, n. 2, p. 597-606. 2001.

Jowett, T. Preparation of nucleic acids. pp. 275-286. 1986. In: D. B. Roberts (eds). **Drosophila: a practical approach**. IRL Press, Washington, D.C.

Kidwell, M. G. & Holyoake, A. Transposon-induced hotspots for genomic instability. **Genome Research**, n. 11, p. 1321-1322. 2001.

Kidwell, M. G. & Kidwell, J. F. Hybrid disgenesis in *Drosophila melanogaster* and the relationship between the P-M and I-R interaction systems. **Genetical Research**, n. 33, p. 105-117. 1979.

Kidwell, M. G. & Lisch, D. R. Transposable elements as source of variation in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, n. 15, p. 7704-7711. 1997.

\_\_\_\_. Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, n. 55, p. 1-24. 2001.

Krimbas, C. D. & Powell, J. R. **Drosophila inversion polymorphism**. Florida: CRC Press, Boca Raton. 1992, 52p.

Labrador, M. & Fontdevila, A. High transposition rates of *Oswaldo*, a new *Drosophila buzzatii* retrotransposon. **Mol. Gen. Genet.**, n. 245, p. 611-674. 1994.

Lankenau, D. H. The retrotransposon family *micropia* in *Drosophila* species. p. 232-241. In: J. McDonald (ed.). **Transposable elements and evolution**. Kluwer Publishers, Amsterdam. 1993.

Lankenau, S.; Corces, G. V. & Lankenau, D. H. The *Drosophila micropia* retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. **Mol. Cell. Biol.**, n. 14, p. 1764-1775. 1994.

Lankenau, D. H.; Huijser, P.; Jansen, E.; Miedema, K. & Hennig, W. *micropia*: a retrotransposon of *Drosophila* combining structural features of DNA viruses, retroviruses and non-viral transposable elements. **J. Mol. Biol.**, v. 204, n. 2, p. 233-246. 1988.

Lankenau, D. H.; Huijser, P.; Jansen, E.; Miedema, H. & Hennig, W. DNA sequence comparison of *micropia* transposable elements from *Drosophila hydei* and *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, n. 99, p. 111-117. 1990.

Lerat, E. & Capy, P. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, n. 9, p. 1198-1207. 1999.

Loreto, E. L. S.; Basso da Silva, L.; Zaha, A. & Valente, V. L. S. Distribution of transposable elements in Neotropical species of *Drosophila*. **Genetica**, n. 101, p. 153–165. 1998a.

Loreto, E. L. S.; Valente, V. L. S. & Zaha, A. Transposable elements in South American populations of *Drosophila simulans*. **Genet. Sel. Evol.**, n. 30, p. 171-180. 1998b.

Machado, M. X.; De Toni, D. C. & Hofmann, P. R. P. Abdominal pigmentation polymorphism of *Drosophila polymorpha* (Dobzhansky and Pavan, 1943) collected on Ilha de Santa Catarina and neighboring islands. **Biotemas**, v. 14, n. 1, p. 87-107. 2001.

Marin, I & Fontdevila, A. Characterization of *gandalf*, a new inverted repeat transposable element of *Drosophila koepferae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 248, n. 4, p. 423-433. 1995.

Marques, E. K.; Napp, M.; Winge, W. & Cordeiro, A. R. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. **D.I.S.**, 41: 147. 1966.

Martinez, M. N. & Cordeiro, A. R. Modifiers of color pattern genes in *Drosophila polymorpha*. **Genetics**, n. 64, p. 573–587. 1970.

Miller, W. J.; McDonald, J. F. & Pinsker, W. Molecular domestication of mobile elements. **Genetica**, n. 100, p. 261-270. 1997.

Montchamp-Moreau, C.; Ronsseray, M.; Jacques, M.; Lehmann, M. & Anxolabéhère, D. Distribution and conservation of sequences homologous to the 1731 retrotransposon in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, n. 10, p. 791-803. 1993.

Napp, M. & Cordeiro, A. R. Heterosis in a wild strain of *Drosophila polymorpha* with a lethal closely linked to the major esterase locus. **Bioch. Genet.**, n. 16, p. 609–617. 1978.

\_\_\_\_. Interspecific relationship in the *cardini* group of *Drosophila* studied by electrophoresis. **Braz. J. Genet.**, n. 4, p. 537–547. 1981.

O'Brochta, D. A.; Sethuraman, N.; Wilson, R.; Hice, R. H.; Pinkerton, A. C.; Levesque, C. S.; Bideshi, D. K.; Jasinskiene, N.; Coates, C. J.; James, A. A.; Lehane, M. J. & Atkinson, P. W. Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. **J Exp Biol.**, n. 206, p. 3823-3834. 2003.

Payant, V. Le polymorphisme de la coloration abdominale dans le genre *Drosophila*. **Ann. Biology**, n. 25, p. 167-184. 1986.

Pelandakis, M. & Solignac, M. Molecular phylogeny of *Drosophila* based based on ribosomal RNA sequences. **J. Mol. Evol.**, v. 37, n. 5, p. 525-243. 1993.

Prud'Homme, N; Gans, M; Masson, M; Terzian, C. & Bucheton, A. *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, n. 139, p. 697–711. 1995.

Puig, M.; Cáceres, M. & Ruiz, A. Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. **PNAS**, v. 101, n. 24, p. 9013-9018. 2004.

Rio, D. *P* transposable elements in *Drosophila melanogaster*. p. 484-518. 2002. In: Craig, N. L.; Craigie, R.; Gellert, M. & Lambowitz, A. M. (eds.). **Mobile DNA II**. Washington, DC: ASM Press. 2002.

Rohde, C. **Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni***. 238f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. 2000.

Rohde, C. & Valente, V. L. S. Ecological characteristics of urban populations of *Drosophila polymorpha* Dobzhansky & Pavan and *Drosophila cardinoides* Dobzhansky & Pavan (Diptera, Drosophilidae). **Rev. Bras. Ent.**, v. 1, n. 40, p. 75–79. 1996a.

\_\_\_\_. Cytological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* and *Drosophila cardinoides*. **Braz. J. Genet.**, n. 19, p. 27–32. 1996b.

Ronsseray, S., Lehmann M. & Anxolabéhère, D. Copy number and distribution of *P* and *I* mobile elements in *Drosophila melanogaster* populations. **Chromosoma**, n. 98, p. 207-214. 1989.

Ruiz, M. T. & Carareto, C. M. A. Characterization of *hobo* element copy number and integrity in Brazilian populations of *Drosophila melanogaster*. **Hereditas**, n. 138, p. 154-157. 2003a.

\_\_\_\_. Copy number of *P* elements, KP/full-sized *P* element ratio and their relationships with environmental factors in Brazilian *Drosophila melanogaster* populations. **Heredity**, v. 91, n. 6, p. 570-576. 2003b.

Schmitz, H. J. **Estudo de assembléias de drosofilídeos do manguezal do Itacorubi, Ilha de Santa Catarina, Brasil**. 69p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. 2004.

Sene, F. M.; Val, F. C.; Vilela, C. R. & Pereira, M. A. Q. R. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 22, n. 33, p. 315-326. 1980.

Silva, J. C.; Loreto, E. L. & Clark, J. B. Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, n. 6, p. 57-72. 2004.

Silva, J. C. & Kidwell, M. G. Evolution of *P* elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. **Genetics**, n. 168, p. 1323-1335. 2004.

Sniegowski, P. D. & Charlesworth, B. Transposable element numbers in cosmopolitan inversions from a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, n. 137: 815-827. 1994.

Stacey, S. N.; Lansman, R. A.; Brock, H. W. & Grigliatti, T. A. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, n. 3, p. 522-534. 1986.

Stalker, H.D. Taxonomy and hybridization in the *cardini* group of *Drosophila*. **Ann. ent. Soc. Am.**, n. 46, p. 343-358. 1953.

Streisinger, G. The *cardini* species group of the genus *Drosophila*. **J. N. Y. Ent. Soc.**, n. 54, p. 105-113. 1946.

Sturtevant, A. H. Notes on North American Drosophilidae with descriptions of twenty-three new species. **Ann. ent. Soc. Am.**, n. 9, p.323-343. 1916.

Townsend, J. I. & Wheeler, M. R. Notes on Puerto Rican Drosophilidae, including descriptions of two new species of *Drosophila*. **J. agric. Univ. P. R.**, n. 39, p. 57-64. 1955.

Trockmorton, L. The phylogeny, ecology and the geography of *Drosophila*. In: King, R. C. (ed). **Handbook of genetics. 3**. New York: Plenum, 1975, p. 421-469.

Val, F. C.; Vilela, C. R. & Marques, M. D. Drosophilidae of the Neotropical region. In: Ashburner, M.; Carson, H. L. and Thompson Jr., J. N. (eds.). **The Genetics and Biology of *Drosophila*. 3a**. London: Academic Press, 1981. p. 123–168.

Vilela, C. R.; da Silva, A. F. G. & Sene, F. de M. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Rev. Bras. Ent.**, v. 2, n. 46, p. 139-148. 2002.

Vieira, C.; Lepetit D.; Dumont S. & Biémont C. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, n.9: 1251-1255. 1999.

Vieira, C.; Nardon, C.; Arpin, C.; Lepetit, D. & Biémont, C. Evolution of genome size in *Drosophila*. Is the invader genome being invaded by transposable elements? **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, n. 19, p. 1154–1161. 2002.

Vieira, C.; Piganeau, G. & Biémont, C. High copy number of multiple transposable element families in Australian population of *Drosophila simulans*. **Genet. Res.**, n. 76, p. 117-119. 2000.

Wilder, J. A. ; Diaz, T.; O'Neill, R. J. W.; Kenney, J. & Hollocher, H. Characterization and isolation of novel microsatellites from the *Drosophila dunni* subgroup. **Genet. Res., Camb.**, n. 80, p. 177-185. 2002.

Wilder, J. A. & Hollocher, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 3, p. 384-392. 2001.

\_\_\_\_. Recent radiation of endemic Caribbean *Drosophila* of the *dunni* subgroup inferred from multilocus DNA sequence variation. **Evolution**, v. 11, n. 57, p.2566-2579. 2003.

Williston, S.W. **Manual of the families and genera of North American Diptera. 2nd edition rewritten and enlarged.** 167p. J.T. Hathaway (ed). 1896.

Wheeler, M. R. The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M.; Carson, H. L. and Thompson, J. N. (eds.).**The Genetics and Biology of Drosophila. 3a.** London: Academic Press, 1981. p. 01-97.

