

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**VARIABILIDADE GENÔMICA DOS ELEMENTOS  
TRANSPONÍVEIS EM ESPÉCIES DO GRUPO  
*mesophragmatica* DO GÊNERO *Drosophila***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

***Erika Germanos***

**Santa Maria-RS, Brasil, 2005**

**VARIABILIDADE GENÔMICA DOS ELEMENTOS  
TRANSPONÍVEIS EM ESPÉCIES DO GRUPO  
*mesophragmatica* DO GÊNERO *Drosophila***

**por**

**Erika Germanos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biodiversidade Animal,  
Área de Concentração Biologia Evolutiva  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Biodiversidade Animal**

**Orientador :Prof. Dr. Élgion L. da S. Loreto**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Curso de Mestrado em Ciências Biológicas  
Biodiversidade Animal**

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

**VARIABILIDADE GENÔMICA DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS  
EM ESPÉCIES DO GRUPO *mesophragmatica* DO GÊNERO *Drosophila***

elaborada por

**Erika Germanos**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Elgion L. da S. Loreto**  
(Presidente/Orientador)

---

**Bartholomei Santos (UFSM)** **Marlise Ladevoet**

---

**Luciano Basso da Silva (FEEVALE)**

Santa Maria-RS, Brasil, 2005.

*A quem ainda acredita que a Universidade  
Pública é um espaço de aprendizado, busca e  
transformação a qual temos o privilégio de  
participar e o dever de contribuir com  
trabalho e educação de qualidade...*

*E ao meu amado Marcelo...*

## AGRADECIMENTOS

Para aqueles que vou agradecer o resto da vida e ainda vai ser pouco...OBRIGADA, muitoobrigada!!! Meus queridos Terezinha, Wilson e filhos; Adriana, Camila e Júnior. Com vocês se aprende a fazer o bem, a ser otimista, a compreender as diferenças e a ser generoso!

Ao professor Dr. Élgion pela orientação.

Aos professores Dr. Sandro Santos e Dr<sup>a</sup> Sônia Cechin pela força inicial e apoio constante.

Aos Prof. Luciano Basso, Marlise B. Santos e Vera Valente por participarem da banca examinadora.

Ao prof. Dr. Kleber Del Claro, meu eterno orientador, por ter me apoiado numa hora crucial em que tudo parecia perdido... E acima de tudo acreditar no meu potencial. Minha eterna gratidão, admiração e respeito que cultivo desde os tempos da graduação. Obrigada por sua amizade e incentivo.

Aos colegas de laboratório mais recentes, Luciele, Mauro, Gabriel, por sua companhia e ajuda nas rotinas laboratoriais. Nina por sua simpatia e alegria sempre contagiantes. Juline e Carol que são pessoas tão doces, e sempre me recebiam com sorrisos...

As colegas de laboratório que já se foram em busca de novos caminhos Lizandra e Juliana por sua grande ajuda e amizade.

As AMIGAS e fiéis companheiras Amanda e Manuela por todo o conhecimento que foi ADQUIRIDO e COMPARTILHADO, pela ajuda diária nas rotinas do laboratório... Obrigada por me ajudarem a superar todos os problemas... Enfim por tudo que aprendi e dividi com vocês !!!

Aos AMIGOS que primeiro me acolheram na “terra gaúcha” Rubinho, Lu e Marina! Pelo futebol com o Marcelo, pelo bate papo, pela parceria. Pelo ombro amigo tantas vezes em que nada fazia sentido... Obrigada do fundo do meu coração!

Aos AMIGOS da minha turma de mestrado Carlos e Alcemar por serem os únicos a me fazerem rir... mesmo quando tudo parecia perdido nesta dura jornada... Vocês são demais!!!

As queridas amigas Rafaele, Bibiana, Odara, Simone, pela bela parceria e por poder dividir com vocês o peso de tantas dificuldades...e dar boas risadas também !!!

Aos amigos Luis e Pedro pelas risadas momentos de descontração e pelas boas conversas!

*E a você, Marcelo... por me ajudar a passar por todas as fases, ser presente, fiel, companheiro, compreensivo, amoroso e meu amigo...Enfim Por TUDO!!!*

***“Todos temos algo a dar e a  
receber, o que vale mesmo é o querer;  
ensinar e aprender”***

*(trecho retirado do livro: “As distintas faces do  
comportamento animal”, editado pelo  
Prof. Dr. Kleber Del Claro-UFU).*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Ciências Biológicas - Biodiversidade Animal  
Universidade Federal de Santa Maria

### VARIABILIDADE GENÔMICA DOS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM ESPÉCIES DO GRUPO *mesophragmatica* DO GÊNERO *Drosophila*

Autora: ERIKA GERMANOS  
Orientador: Élgion L. da Silva Loreto  
Local e data da defesa: Santa Maria, 25 de Abril de 2005.

O grupo *mesophragmatica* pertence à radiação *virilis-repleta* do sub-gênero *Drosophila*, foi estabelecido por Brncic & Koref em 1957. As espécies deste grupo apresentam algumas características de espécies endêmicas isoladas em vários locais nos Andes. O ancestral comum das espécies do grupo parece ter adquirido, por pressão seletiva, estruturas gênicas melhor ajustadas a cada região. Embora existam alguns estudos envolvendo estas espécies pouco se sabe em relação à presença e evolução de elementos transponíveis em seus genomas. Neste contexto, os elementos transponíveis das famílias, *hobo*, *Tom/17.6*, *I*, *mariner*, *P*, *micropia* e *gypsy* foram analisados em espécies de *Drosophila* do grupo *mesophragmatica* usando, Dot Blot e PCR. O DNA genômico das espécies *D.viracochi*, e uma das linhagens de *D. gasici* apresentaram hibridização para o elemento *micropia* quando analisadas por Dot Blot. Análise da presença dos TEs das famílias *Tom*, *17.6*, *hobo* foi feita por PCR. Porém, não foram obtidos amplicons para nenhum destes elementos. No entanto seqüências homólogas ao elemento *P* estão presentes em *D. gasici* e *D. pavani*. Utilizando sonda dos elementos *I* e *mariner* foram realizados Dot Blots não apresentando hibridização com DNA genômico das espécies *D. pavani*, *D. brncici*, *D. viracochi*, *D. gasici* (três linhagens diferentes). DNA genômico das espécies *D. pavani*, *D. brncici*, *D. viracochi*, *D. gasici* (três linhagens diferentes) hibridizaram com sonda do elemento *gypsy* havendo também amplificação por PCR para todos as espécies analisadas. Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados. Análise filogenética a partir destas seqüências reforçou a idéia de que haja incongruências entre a filogenia das espécies e de seus TEs devido a um padrão de evolução complexa que envolva mecanismos como: perdas estocásticas, transferência vertical e horizontal, polimorfismo ancestral, diferentes taxas de evolução sendo não mutuamente excludentes e provavelmente ocorram simultaneamente.

Palavras-chave: *Drosophila*, *mesophragmatica*, evolução complexa, elementos transponíveis

## ABSTRACT

Animal Biodiversity Master Graduate Program  
University Federal of Santa Maria

### **Genomic Variability of transposable elements in *mesophragmatica* group species of Genus *Drosophila***

ERIKA GERMANOS

Advisor: Élgion L. da Silva Loreto

Place and date: Santa Maria, April 25<sup>th</sup>, 2005.

The *mesophragmatica* group belongs to the radiation *virilis-repleta* of the *Drosophila* subgenus, it was established by Brncic and Koref in 1957. The species of this group present some characteristics of isolated endemic species in some places in Andes. The common ancestral of the species of the group seems to have acquired, for selective pressure, genetics structures better adjusted to each region. Although there is just a few studies involving these species and still have to be done in relation to the presence and evolution of transposable elements in its genomes. In this context, the transposable elements of the families, *hobo*, *Tom/17.6*, *I*, *mariner*, *P*, *micropia* and *gypsy* had been analyzed in species of *Drosophila* of the *mesophragmatica* group using, Dot Blot and PCR. The genomic DNA of species *D.viracochi*, and one of the *D. gasici* had presented hybridization for the *micropia* element when analyzed by Dot Blot. Analysis the presence of the TEs of the families *Tom*, *17.6*, *hobo* was made by PCR. However, they had not been gotten amplicons for none of these elements. However homologous sequences to element *P* are found in *D. gasici* and *D. pavani*. Using probe of the elements *I* and *mariner* they had been carried through Dot Blot not presenting hybridization with genomic DNA of species *D. pavani*, *D. brncici*, *D. viracochi*, *D. gasici* (three different populations). Genomic DNA of species *D. pavani*, *D. brncici*, *D. viracochi*, *D. gasici* (three different populations) hybridized with probe of the element *gypsy* also having amplification for PCR for all the analyzed species. The purify products of PCR had been sequenced. Phylogenetic analysis s confirmed the idea that it has incongruence between the phylogeny of the species and of its TEs due to a standard of complex evolution that involves mechanisms as: random losses, vertical and horizontal transference, ancestral polymorphism, different taxes of evolution. Those mechanisms might be not mutually excludable and probably occur simultaneously.

Key-words: *Drosophila*, *mesophragamatica*, complex evolution, transposable elements



## SUMÁRIO

Introdução .....	Página 1
Os Elementos transponíveis.....	Página 1
Filogenia dos Elementos Transponíveis.....	Página 5
O grupo <i>mesophragmatica</i> .....	Página 7
Objetivos .....	Página 10
Capítulo 1	
The occurrence of transposable elements in populations of <i>Drosophila</i> ( <i>mesophragmatica</i> group-Drosophilidae).....	Página 11
Capítulo 2	
Evolution of <i>gypsy-like</i> sequences in species of <i>mesophragmatica</i> group of <i>Drosophila</i> .....	Página 26
Discussão, Conclusões e Perspectivas.....	Página 41
Referências Bibliográficas.....	Página 43

## Introdução

---

A teoria evolutiva proposta por Charles Darwin (1859) perdura em sua essência até os dias de hoje e foi uma das mais audaciosas propostas científicas numa época em que se atribuía todo e qualquer fenômeno a Criação e Vontade Divina. Darwin foi atormentado por sua própria consciência, preparou a sociedade e a comunidade científica para receber sua teoria por anos (Desmond and Moore, 1995). Talvez não tão atormentados quanto Darwin mas não menos importantes os evolucionistas atuais estão às voltas com novas questões a respeito do processo evolutivo.

Sabemos hoje que o surgimento da genética como ciência somada as teorias evolutivas elucidou questões a respeito da evolução dos organismos e a transmissão de características através das gerações. O genoma das espécies, hoje pode ser entendido como uma entidade dinâmica e não estática como se acreditava até a descoberta das seqüências genéticas móveis, também chamados de elementos transponíveis (TEs). Estas seqüências de DNA, capazes de mudar de posição dentro do genoma foram descobertos por Bárbara McClintock, e vem sendo investigados desde o fim dos anos 40.

Da mesma forma que a teoria da seleção natural de Darwin precisou de tempo para ser absorvida pelos cientistas e pela sociedade, a descoberta de McClintock foi, por ela mesma, anunciada como talvez não aceita de imediato pela maioria dos geneticistas e por muitos outros biólogos. Contudo, a partir do final da década de 70 com o advento das técnicas de DNA recombinante e seqüenciamento, os TEs que conferem essa intrigante propriedade de dinamicidade ao patrimônio genético puderam ser encontrados e mais profundamente investigados tanto em procariotos como em eucariotos.

### **Os Elementos Transponíveis (TEs)**

Os Elementos Transponíveis (TEs) são definidos como seqüências de DNA repetido no genoma. Além disso, sua definição engloba outras características peculiares como a capacidade de se mover dentro do genoma, causar duplicação do sítio de inserção, apresentar polimorfismo

de sítios de inserção e variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Capy et al, 1998).

A mobilidade dos TEs pode afetar o DNA dos organismos causando alterações na organização estrutural do genoma e codificando produtos gênicos que interagem nos processos celulares. A presença dos TEs pode gerar rearranjos estruturais tais como: deleções, duplicações inversões. O resultado final de todo este processo pode ser a modificação da estrutura e expressão de um gene, criando mutações que podem ser morfológicas ou regulatórias (Capy et al, 1998).

Ainda existe dúvida a cerca da origem dos TEs estar relacionada ao surgimento dos seres vivos ou se seria um fenômeno mais recente. Capy et al, (1998) sugerem que a presença destes elementos em todos os seres vivos sustente a hipótese de que a origem dos transposons é um evento antigo e relacionada a sua primitiva ligação ao genoma. Neste contexto, análises mais detalhadas realizadas recentemente induzem a conclusão de que não existe um modelo geral que descreva todos os elementos e a maneira que eles se comportam em todos os organismos (Biémont, 1992).

As interpretações mais atuais das hipóteses sobre a história evolutiva dos TEs assumem que são provavelmente de grande importância para a evolução do genoma hospedeiro. Estas seqüências móveis podem ser fonte de diversidade genética, permitindo repostas a mudanças ambientais (McDonald, 1995; Capy et al, 1998; Kidwell and Lisch, 2000).

### **Classificação dos Elementos Transponíveis**

Os elementos de transposição possuem variabilidade quanto à estrutura e o mecanismo de transposição e são divididos em duas classes de acordo com esses critérios (Finnegan, 1989; Capy et al, 1998). Os elementos da classe I, Retrotransposons, se transpõem via um intermediário de RNA. Elementos de classe II, conhecidos como Transposons, se transpõe via DNA.

Os elementos de classe I possuem transposição replicativa e são estruturalmente bastante variados. Existem elementos complexos, semelhantes a retrovírus na estrutura e modo de transposição. Além de elementos simples que não codificam nenhuma enzima e dependem de enzimas fornecidas por outros TEs para se transporem. Os elementos *gypsy*, *tom*, *17.6* e *micropia* são exemplos de retransposons com LTRs (Long Terminal Repeats), presentes em *Drosophila*,

possuem seqüências longas terminais repetidas e diretas, e regiões que codificam enzimas para sua replicação e transposição (Capy et al, 1998).

O grupo dos retroposons não possui LTRs e possuem na extremidade 3' uma cauda poliA, quando são capazes de codificar a transcriptase reversa são chamados de LINEs (“long interspersed nucleotid elements”), e se não codificam enzimas para sua própria transposição são chamados de SINEs (“short interspersed nucleotid elements”).

Os SINEs variam de 75 a 500 pb, sendo abundantes nos mamíferos, como as seqüências *Alu* dos primatas e *BI* dos roedores. Os LINEs estão presentes em muitas espécies eucarióticas, os mamíferos possuem uma única grande família LINE conhecida como *L1*. *Drosophila melanogaster* é outro exemplo de espécie que possui em seu genoma alguns elementos LINEs tais como: *I*, *Doc*, *jockey* (Capy et al, 1998).

Os elementos de classe II caracterizam-se por possuírem repetições terminais invertidas e transpõe-se diretamente via um intermediário de DNA utilizando a enzima transposase. Os TEs desta classe utilizam tanto o método replicativo como o método conservativo de replicação. Com base na seqüência de aminoácidos segundo Cummings, (1994) pode-se dividir os TEs de classe II em três principais grupos: *Ac/hobo*; *Tc1/ mariner* e *P*.

### **Elementos de transposição e evolução do genoma hospedeiro**

A idéia de um genoma mais plástico, pela ação dos TEs, emerge com uma nova maneira de interpretar a evolução dos organismos. O movimento dos TEs sendo aceito como gerador de variabilidade genética, e essa sendo selecionada, asseguraria uma rápida adaptação das populações ou das espécies para uma nova condição ambiental. Apesar disso, a relação entre os transposons e seus hospedeiros são complexas e ainda não totalmente entendidas (Capy et al, 1998).

Elementos de transposição compõe uma fração significativa do genoma dos organismos. Embora exista uma enorme variação entre número de cópias, distribuição e tipos existentes de TEs de uma espécie para a outra (Berg and Howe, 1989). Sabe-se que 10-20% do genoma de *D. melanogaster* é constituído por TEs (Finnegan, 1986). Um indivíduo pode carregar cerca de 50 diferentes famílias de transposons com até mesmo 100 cópias de alguns deles em seu genoma (Engels, 1992).

A análise do genoma seqüenciado de *D. melanogaster*, mostrou a existência de 96 famílias de elementos transponíveis (Kaminker et al., 1995)

O genoma humano é constituído de pelo menos 47% de TEs. Os retrotransposons constituem mais de 50% do genoma do milho, o que resultou na duplicação do tamanho do genoma desta espécie em poucos milhões de anos. Outros genomas, entretanto, são mais compactos carregam apenas uma pequena fração de TEs. Porém, ainda não está claro se um alto número de cópias de TEs seria selecionado positivamente, uma vez que elevaria a flexibilidade do genoma do hospedeiro tendo assim ganhos evolutivos (Kidwell and Lisch, 2000).

O processo de colonização por uma dada espécie, em novos ambientes ocorre concomitantemente com a invasão, aquisição e acúmulo de TEs em seu genoma. Esta hipótese explicaria o aumento no número de TEs presentes em diferentes populações naturais de *D. simulans* estudadas por Biémont et al, (1999). Neste estudo, os autores compararam populações africanas de onde a espécie é originária, com outras de diferentes continentes, sendo estas últimas possuidoras de um maior número de TEs. A partir destes resultados, os autores sugerem que esta espécie, que é cosmopolita, ainda está passando pelo processo em que seu genoma pode estar sendo invadido por TEs (Vieira et al, 1999; Vieira et al, 2002; Vieira and Biémont, 2004).

O aumento do tamanho do genoma também pode ser resultado do aumento do número de cópias dos elementos transponíveis o qual entre outras causas, pode ser motivada pela mobilização induzida por estresse ambiental (Kidwell and Lisch, 1997). Quando populações estão sujeitas a novas condições ambientais alguns dos seus TEs se tornam ativados e ocorre o aumento do tamanho do genoma (Capy et al., 2000).

Os elementos de transposição em muitas espécies são distribuídos de modo não aleatório, sendo facilitados por características específicas de regiões particulares do genoma hospedeiro. Encontra-se TEs não aleatoriamente distribuídos na heterocromatina em que cada classe de TE ocupa uma distinta região (Kidwell and Lisch, 1997).

Os genomas hospedeiros, ou genes particulares podem interagir com os TEs e influenciar sua transposição independente de todos os fatores necessários para a transcrição de DNA utilizadas pelos TEs. Este mecanismo pode ser ilustrado pelo gene *flamenco* e o elemento de transposição *gypsy* de *Drosophila melanogaster*. O gene *flamenco* está no cromossomo X e possui dois tipos de alelos: um deles permite a transposição do elemento *gypsy*, *flam*<sup>1</sup> e o outro, *flam*<sup>+</sup> não permite.

O gene *flam* possui efeito materno e atua na mobilização do elemento transponível *gypsy*, a transposição ocorre apenas em fêmeas homozigotas para o alelo *flam*<sup>1</sup> (Pélisson et al, 1997).

Os elementos transponíveis, de maneira geral, possuem suas próprias seqüências regulatórias que modulam sua transcrição. Vários estudos realizados com o elemento *P* acumularam informações sobre a sua estrutura e seu sistema de transposição. Para este TE a regulação tem um efeito materno e sua transposição é limitada na linhagem germinal por um processamento alternativo do mRNA da transposase. Este processo é regulado pelo hospedeiro e herdado maternalmente. Sabe-se que outros elementos da Classe II parecem ser menos dependentes do genoma hospedeiro. Por exemplo nos TEs *hobo* e *mariner* este fenômeno ocorre em outras famílias de espécies como Muscidae, Tephritidae (Coates et al, 1995).

No caso do elemento *Activator (Ac)* em *Zea mays*, a sua atividade pode ser regulada pela presença ou não de metilação (presença de grupamentos metil na molécula de citosina) em determinadas seqüências do elemento. A variação no padrão de metilação promove uma oscilação entre uma fase ativa e uma fase inativa (Chandler and Walbot, 1986).

Recentemente, existe uma série de discussões a respeito do papel da metilação no caminho da regulação gênica. Em mamíferos foi postulado que estaria ligada a variações na expressão gênica. No entanto, pela presença de um elevado número de TEs nos mamíferos; Yoder et al, (1997) assumem que flutuações nos níveis de metilação durante o desenvolvimento representam mudanças no grau de metilação dos transposons. Em *Ciona intestinalis*, uma espécie de cordado invertebrado, os genes ativos são predominantemente metilados e os transposons são hipometilados (Simmem et al, 1999). Deste modo, seja o papel primário da metilação regular os transposons ou regular a expressão gênica do hospedeiro, o que parece ser ponto comum é a sua importância em ambos os processos (Kidwell and Lisch, 2000).

### **Filogenia dos Elementos Transponíveis**

A comparação entre a filogenia dos TEs e a filogenia das espécies hospedeiras é feita com o intuito de se compreender a evolução dos TEs. Estas comparações trazem, muitas vezes, inconsistências entre as filogenias. Desta forma algumas questões são levantadas a respeito destas diferenças e hipóteses têm sido formuladas para tentar explicá-las.

Além da propensão natural que os TEs tem de se difundir intragenomicamente e/ou por transmissão vertical, existem evidências concretas de que os TEs têm a capacidade de transpor as

fronteiras que separam espécies e penetrar novos genomas. Esta transmissão entre espécies diferentes sem que haja transmissão sexual de material genético é chamada de transmissão horizontal ou lateral também chamada de transferência horizontal.

Para se formar um cenário mais claro de transmissão horizontal é importante que as relações filogenéticas entre as espécies hospedeiras se estabeleça de forma robusta. *Drosophila* por ser um organismo modelo possui na literatura, uma série de estudos envolvendo filogenias a partir de caracteres morfológicos, representados pelos clássicos trabalhos de Throckmorton (1975) e mais tarde complementados por Grimaldi (1990). Todavia existem algumas lacunas a serem preenchidas para o subgênero *Drosophila*, uma vez que a maioria dos estudos envolve espécies mais relacionadas a *D. melanogaster* subgênero *Sophophora*. As seqüências mais estudadas numa perspectiva filogenética envolvem os genes nucleares *Adh* (Russel et al., 1995), mtDNA (deSalle, 1995), Sod (KWIATOWSKI et al., 1994) e mais recentemente *amd* e COII (Hobe et al., 2005).

Um dos casos mais estudados de transmissão horizontal é o do elemento *P*. As seqüências deste elemento diferem em apenas um nucleotídeo entre as espécies *D. melanogaster* e *D. willistoni* fato que não é compatível com os 50 milhões de anos que separa estas duas espécies. Além disso é interessante ressaltar que as outras espécies do grupo *melanogaster* não possuem este TE. Neste caso específico pode se inferir que provavelmente *D. melanogaster* tenha sido invadida pelo elemento *P* por volta de 1950 já que estoques mantidos em laboratório antes desta data são desprovidos destas seqüências. Além deste exemplo alguns autores já reportaram casos de transmissão horizontal envolvendo o elemento *P* (Clark and Kidwell, 1997; Silva and Kidwell, 2000; Loreto et al., 2001).

A alta taxa de similaridade entre diferentes *taxa*, topologia divergente entre as árvores de TEs e de seus hospedeiros, distribuição não homogênea de um elemento entre as espécies e invasão recente de um genoma por um elemento são fatores que se ocorressem simultaneamente tornariam a hipótese de transmissão horizontal mais aceita (Capy et al., 1998). Todavia, é importante que haja uma sobreposição temporal, ecológica e geográfica para que tal fenômeno ocorra.

Capy et al., (1998) ressaltam a relevância de se analisar as hipóteses alternativas; como diferentes taxas de evolução entre espécies diferentes ou polimorfismo ancestral, antes de se evocar a transmissão horizontal como sendo uma única explicação para as diferenças entre árvores filogenéticas das espécies e dos TEs.

## Evolução Complexa

Quando analisamos as filogenias obtidas a partir de elementos transponíveis, que visam reconstruir as relações existentes entre estas seqüências, nos deparamos com padrões complexos de evolução. A evolução dos TEs parece ser composta por uma série de fatores que confeririam esta complexidade. Polimorfismo ancestral resultante de cópias que evoluem independentemente no genoma, diferentes taxas evolutivas que dependem de mecanismos de regulação do hospedeiro, fatores ambientais que atuam sobre o organismo, valor adaptativo destas seqüências, reorganização de elementos inativos e/ou incompletos no genoma originando elementos ativos com novas propriedades, transmissão vertical, transmissão horizontal, e perdas estocásticas em eventos de especiação compõem o cenário evolutivo pelo qual os TEs estão sujeitos (revisões em Capy et al., 1998; Pinsker et al., 1999).

A análise das comparações entre as filogenias dos TEs e filogenias das espécies mostram muitas vezes que espécies distantes apresentam uma homologia maior entre as seqüências dos TEs do que aquelas obtidas a partir de espécies de mesmo grupo. Além das distâncias comparativas entre genes nucleares e seqüências de TEs por vezes serem mais divergentes. Neste caso o cenário para a evolução complexa estaria formado, como por exemplo foi reportado por Herédia et al. (2004) analisando o retroelemento *gypsy*.

### O grupo *mesophragmatica*

A família Drosophilidae apresenta apenas duas subfamílias, Steganinae e Drosophilinae (Wheeler, 1982). Na subfamília Drosophilinae o gênero *Drosophila* se destaca por agrupar mais da metade das espécies da família e apresentar uma ampla e diversa distribuição geográfica (Ashburner et al, 1986).

O sucesso na distribuição se deve à alta capacidade das espécies de explorar nichos ecológicos. Estágios larvais são dependentes de organismos fermentadores, sendo assim fundamentais nas teias alimentares (Throckmorton, 1975). Além disso, tem fornecido uma vasta contribuição nos estudos de genética, biologia do desenvolvimento e biologia molecular. Os vários anos de pesquisa em torno do gênero *Drosophila* acumularam conhecimento e modelos aplicados em trabalhos realizados com diversas espécies.

**[p1] Comentário:** A informação do número de sps descritas e o número de famílias de diptera estão desconectadas. Seria interessante dizer o quanto diptera é representativo (em %) dessa variabilidade total.



Devido ao grande número de espécies que encerra o gênero, tornou-se necessário subdividi-lo em subgêneros e ainda mais, os subgêneros são divididos em grupos que reúnem espécies relacionadas por características morfológicas e genéticas. Em muitos casos as espécies do mesmo grupo apresentam grande similaridade morfológica quase indistinguível. Tais espécies chamadas crípticas são freqüentes no gênero *Drosophila*. Este fenômeno é representado por exemplos como: *D. melanogaster* e *D. simulans*, algumas espécies do grupo *willistoni* e do grupo *saltans*.

Existem espécies cosmopolitas como *D. melanogaster*, *D. funebris*, *D. immigrans*, *D. hydei*, e outras cuja estrutura populacional e ecologia são fortemente influenciadas pelas atividades humanas. Outras espécies, porém, são adaptadas a ambientes ainda protegidos da ação antrópica o que as confere distribuição, muitas vezes, restrita a uma determinada área. Analisando espécies de *Drosophila* que habitam ambientes ecologicamente diversificados, sem barreiras geográficas, observa-se intenso fluxo gênico interpopulacional. *D. willistoni*, *D. pseudoobscura* e *D. robusta* podem ser citadas como exemplos de tais espécies (Brncic, 1958).

Em ambientes que apresentam barreiras geográficas e ecológicas à distribuição das espécies de forma descontínua, interfere no fluxo gênico entre as populações. Neste contexto observam-se organismos ajustados a ambientes especializados e raros. Formas não domésticas dos grupos *repleta* e *virilis* apresentam esta característica. Assim, analisando a distribuição geográfica do grupo *mesophragmatica* é muito provável que os seus representantes apresentem propriedades de espécies endêmicas (Brncic, 1958).

O grupo *mesophragmatica* pertence à radiação *virilis-repleta* do sub-gênero *Drosophila*, foi estabelecido por Brncic and Koref (1957). Este grupo é composto pelas seguintes espécies: *D. mesophragmatica* (Duda, 1927); *D. gaucha* (Jaeger and Salzano, 1953); *D. pavani* (Brncic, 1957); *D. altiplanica* (Brncic and Koref, 1957); *D. orkui* (Brncic and Koref, 1957); *D. viracochi* (Brncic and Koref, 1957); *D. gasici* (Brncic, 1957), *D. brncici* (Hunter and Hunter, 1964). A distribuição geográfica deste grupo com exceção de uma das espécies, a *D. gaucha*, é essencialmente Andina (Brncic, 1958).

*D. pavani* é encontrada na região centro-norte do Chile e Argentina, onde sua distribuição se sobrepõe a de outra espécie, *D. gaucha* que parece ser a espécie de maior distribuição, sendo encontrada na Argentina, região sul do Brasil, Uruguai e Bolívia, porém é rara na região tropical do Brasil. *D. brncici* tem sido encontrada somente na Colômbia (Brncic et al, 1971).

*D. mesophragmatica* é a mais abundante das espécies do grupo. Está distribuída em altas altitudes na Bolívia e no Peru, além de várias partes da Colômbia. Nestas regiões da Colômbia há também a incidência de outra espécie do grupo, *D. viracochi*. *D. gasici* é relativamente uma espécie rara, mas distribuída desde a Colômbia até o norte do Chile e Argentina (Hunter & Hunter, 1964).

*D. orkui*, *D. mesophragmatica* e *D. viracochi* são espécies simpátricas encontradas com frequência no Peru. Existem registros de *D. altiplanica* ocupando ambientes de altitudes elevadas de aproximadamente 7000 m (Brncic, 1958).

Todas as espécies do grupo *mesophragmatica*, de maneira geral, podem ser diferenciadas morfológicamente, no entanto *D. gaucha* e *D. pavani* são dificilmente diferenciadas apenas por caracteres morfológicos ou análise da genitália externa masculina (Brncic and Koref, 1957).

Nacur (1958) dividiu este grupo em dois, com base na morfologia externa. Um grupo constituído por *D. pavani*, *D. gaucha*, *D. mesophragmatica*, *D. altiplanica* e *D. orkui*; o outro formado por *D. viracochi*. Entretanto análise das relações citotaxonômicas para revisar a filogenia do grupo foi apresentada por Brncic et al, (1971).

O estudo de cromossomos politênicos, extraídos de glândulas salivares, e análise do cariótipo por comparação das placas metafásicas revelou que existem pelo menos dezesseis inversões paracêntricas no estudo da história evolutiva do grupo *mesophragmatica*. A partir destas análises foi possível estabelecer três ramos evolutivos, um deles dando origem a *D. mesophragmatica*, *D. brncici* e *D. gasici*, outro originando *D. viracochi*, e um terceiro ligando *D. gaucha* e *D. pavani* (Brncic et al, 1971).

As espécies do grupo *mesophragmatica* apresentam algumas características de espécies endêmicas isoladas em vários locais nos Andes. O ancestral comum das espécies do grupo parece ter adquirido, por pressão seletiva, estruturas gênicas melhor ajustadas a cada região. A alta taxa de polimorfismos portanto pode contribuir para a adaptação e ajuste a ambientes raros (Brncic, 1957).

Os estudos citogenéticos realizados por Brncic et al. (1971) tentam estabelecer relações filogenéticas entre as espécies do grupo *mesophragmatica*. No entanto pouco se conhece no âmbito da biologia molecular para auxiliar o entendimento destas relações.

## Objetivos

---

### Objetivo Geral

Este trabalho busca contribuir para o conhecimento da presença e variabilidade genômica dos Elementos Transponíveis em espécies do grupo *mesophragmatica* do gênero *Drosophila*, que possuem distribuição geográfica considerada endêmica, tentando compreender como os genomas destas espécies vêm evoluindo.

### Objetivos Específicos

#### Capítulo 1

1. Analisar a presença dos Elementos Transponíveis *mariner*, *micropia*, *I* por Dot Blot no genoma de espécies do grupo *mesophragmatica*.
2. Analisar a presença dos elementos *P*, *Tom /17,6*, *hobo* e *gypsy* por PCR.
3. Seqüenciar os TEs que obtivermos amplicons

#### Capítulo 2

1. Análise da filogenia do Elemento Transponível *gypsy* a partir das seqüências obtidas.

## Capítulo 1

---

### The occurrence of transposable elements in populations of *Drosophila* (*mesophragmatica* group-Drosophilidae)

**Keywords:** *Drosophila*, *mesophragmatica*, transposable elements, evolution, distribution.

**Germanos, Erika.** (Curso de mestrado em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil).

**Loreto, Élgion da S. L.** (Curso de mestrado em Biodiversidade Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil).

\*Trabalho será enviado para DIS (*Drosophila* Information service)

## Abstract

Transposable elements have been of much interest lately. Indeed, it has been already known that this middle repetitive DNA sequences have the potential to play an important role in the evolutionary process of their host genomes. TEs are classified in families according to their sequences similarity. Two major classes are distinguished by their different modes of transposition. There are some reports done including the distribution of TEs in *Drosophila* genus there is no data available addressing to *mesophragmatica* group of *Drosophila* a particular attention. The species that compound this group are distributed in the Neotropical region. The *mesophragmatica* group of *Drosophila* is probably the most typical cluster of species occurring almost exclusively in the Andes system of mountains. This work aims to provide a brief communication about the distribution of TEs (*I*, *mariner*, *hobo*, *gypsy*, *Tom/17.6*, *micropia* and *P* elements) within *mesophragmatica* group of *Drosophila*. The elements *gypsy* and *micropia* are present in the genome of all species studied, while the *P* element has been found in just two species *D. pavani* and *D. gasici*. The others TE s investigated were not found in these species, which in some cases was expected. There are questions and study that still have to be done for these species about TE and their role in genome evolution of the *mesophragmatica* group species.

**Key words:** *mesophragmatica*, *Drosophila*, transposable elements, distribution.

## Introduction

A wealth of data has accumulated on the variety and distribution of transposable elements (TEs). A large number of families have been described in a wide range of species. Most of these elements have been found in *Drosophila* and plant species, but they are also present in protozoa, fungi, nematodes, vertebrates, and insects other than *Drosophila*.

Transposable elements have been of much interest lately. Indeed, it has been already known that this middle repetitive DNA sequences have the potential to play an important role in the evolutionary process of their host genomes (Finnegam, 1989; Kidwell and Lisch; 1997, Kidwell and Lisch, 2000).

The idea that TEs are primarily parasitic is not at all inconsistent with a role for these elements in the evolution of their hosts. There are some evidences for co adaptation by both elements and their hosts to the long-term presence in the genome of these parasitic sequences. Actually, it appears that this co adaptation could lead to benefits for TE and host (Kidwell and Lisch; 1997). Adaptations have sought to identify a benefit for the host in the proliferation of TEs and, while this might be true in some cases, most transposons should be regarded as highly specialized intragenomic parasites that are disseminated largely by vertical transmission and provide no benefit to the host. The genome is an ecological niche, and it was inevitable that the resources available there should come to be exploited by specialized replicating entities (Yoder *et al.*, 1997).

Like viruses, TEs are dependent on their host organism for survival, but unlike viruses, most TEs do not have phase in their life cycle in which they can survive independent of their hosts. Therefore, coevolution and coadaptation of TEs with host genomes is expected to play an important role in the long time survival of these elements families. Given that the majority of new insertions tend to be deleterious to hosts, it is in the interests of both parties to mitigate or remove such deleterious effects (Kidwell and Lisch, 1997).

TEs are classified in families according to their sequences similarity. Two major classes are distinguished by their different modes of transposition (Finnegam, 1992). Class I elements are retroelements that use reverse transcriptase to transpose by means of an RNA intermediate. They include long terminal repeat retrotransposons and long and short interspersed elements (*LINES*

and *SINES*, respectively). Long terminal repeats retrotransposons are closely related to other retroelements of major interest, such as retroviruses. Class II elements transpose directly from DNA to DNA and include transposons such as the *P* element in *Drosophila*.

Most, but not all, TE families are made up of both autonomous and nonautonomous elements. Whereas autonomous elements code for their own transposition, nonautonomous elements lack this ability and usually depend on autonomous elements from the same, or a different, family to provide a reverse transcriptase or transposase *in trans*.

The distribution patterns have been described for a number of different mobile elements families of *Drosophila* genus, such as the *P* element family (Stacey et al., 1986; Anxolabéhère & Periquet, 1987; Daniels et al., 1990a; Loreto et al., 1998); *I* (Bucheton et al., 1986; Stacey et al., 1986); gypsy (Stacey et al., 1986; Heredia et al., 2004); hobo (Daniels et al. 1990b); mariner (Maruyama and Hartl, 1991; Brunet et al., 1994). For review see Biémont and Cizeron (1999).

Although, there are some reports done including the distribution of TEs in *Drosophila* genus there is no data available addressing to *mesophragmatica* group of *Drosophila* a particular attention. The species that compound this group are distributed in the Neotropical region. The *mesophragmatica* group of *Drosophila* is probably the most typical cluster of species occurring almost exclusively in the Andes system of mountains (Brncic et al., 1971).

This work aims to provide a brief communication about the distribution of TEs (*I*, *mariner*, *hobo*, *gypsy*, *Tom/17.6*, *micropia* and *P* elements) within *mesophragmatica* group of *Drosophila*.

## **Material and Methods**

### **Fly Stocks and DNA extraction**

The species of *mesophragmatica* group studied were *D. pavani* (Brncic, 1957); *D. viracochi* (Brncic and Koref-Santibanez, 1957); *D. brncici* (Hunter & Hunter, 1964) and *D. gasici* (Brncic, 1957). For *D. gasici* three populations (Arica-Chile, Colombia, Cochabamba-Bolivia) were analyzed. All strains employed were maintained in the laboratory by massal mating under standard conditions. Genomic DNA was prepared from approximately 100 adults flies per sample and was extracted according to Jowett (1986) with some adjusts.

## PCR amplification

### *Tom/17.6*

About 100 ng of genomic DNA were amplified for 35 cycles (94°C, 45s; 53°C, 45s; 72°C, 1min) using the following oligonucleotides primers T12A (5'AGTWTGGGCSACAAARAC 3'), and T12B (5'CCGTCYCTRTCYGCCTTT 3') to investigate the presence of *Tom/17.6* sequences in species of *mesophragmatica* group.

### *gypsy*

The pair of degenerated primers used to amplify *gypsy* in genomic DNA from adults of all species were: GYP3S2 5' AAAGGCGAYTTGGTTGACACTCC3'; GYP3AS2 5'CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG 3', described by Heredia *et al* (2004), as well as the reaction used for the amplification. The *gypsy*-homologous sequences were amplified using the pair of primers GYP3S2 (sense) and GYP3AS2 (antisense) under PCR conditions as described in Heredia *et al.* (2004).

### *hobo*

PCR reactions were performed an initial denaturation for 2min at 94°C, 35 cycles consisting of 1 min denaturation at 94°C, 45 s annealing at 50°C and 1 min extension at 72°C were carried out. An additional extension step of 7 min at 72°C was performed after the last cycle. The primers used were: P651: 5' CACCTCCAATTTATCCCGCC 3' and P1597: 5' GGATGGAATACGAAGC 3'.

### *micropia*

Polymerase chain reactions (PCR) were performed in 25ml 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, 45 min annealing at 55°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 high annealing temperatures that make sure the signals specificity. The amplified fragment has 812bp and corresponds to nucleotides from 177 to 2589. They were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel. For positive signal were used the dhMiF2 plasmid amplification.

### ***mariner***

Polymerase chain reactions (PCR) were performed in 25ml 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, 45 min annealing at 53°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 were Mar-fw: 5' TGGGTNCCNCAYGARYT 3' and Mar-rv 5' GGNGCNARRTCNGGNSWRTA 3', described by Robertson and Macleod (1993). The amplified fragment has 473bp. They were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

### ***P element Family***

Polymerase Chain Reaction (PCR) for *P* element sequences were carried out with 100 ng of genomic DNA in a solution of 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 μM of each deoxynucleotide, 100pmol of two primers and 1U of Taq polymerase in a volume of 50 μl. PCR consisted of 35 cycles of 45s of denaturation at 94°C, 45s for primer annealing at 50°C, and 1min. of primer extension at 72°C. In the very first cycle there was a longer denaturation period of 2min. at 94°C, and in the very last, an elongation step of 7 min at 72° C. The following degenerated primers described by Lee *et al.* (1999) were used to amplify *P* homologous sequences:

2684: 5'GCTATTTGNYTNCAYACCGCNGG 3'

2687: 5'CCCAATGNATWGCANCGTCTKAT 3'

After PCR the product was separated on a 0.8% agarose gel, blotted onto a nylon membrane (Hybond N+/Amershan) and hybridized. As a probe for *P* element was employed the pπ25.1

plasmid, which contains a 2.8-kb fragment amplified by PCR from the *P* element. The hybridization was performed at 60°C. Washing was as follows: two times with 0.2X SSC and .5% SDS for 15 min at 60°C.

### **Dot Blot**

The transposable elements *I*, *mariner*, *micropia* were investigated by dot blot for all species. DNA samples (approximately 2 µg of DNA for each strain) were boiled for 5 min, then 5 min in the freezer, and applied onto a nylon membrane (Hybond N+/Amersham). DNA was fixed at 80°C for 2 h.

The membranes were hybridized to a random primer-labeled probe at 60°C in 5x SSC; 0.1% SDS; 5% dextran sulfate, and 20-fold dilution of liquid block. The filters were washed twice with 0.2 x SSC and 0.5% SDS for 15 minutes at 60°C. Hybridization and detection were performed by using Gene Images KIT (Amersham Biosciences) according to the manufacture's instructions.

### **Probes**

As probe were used the following plasmid to study mariner element: Mos1 plasmid (Maruyama & Hartl, 1991). The I TE family members were probed with the pI786 plasmid DNA, which contains a 1kb fragment element derived from the internal region of the *I* element of *D. melanogaster* (see Fawcett *et al.*, 1986). *Micropia*: dhMiF2 plasmid (Huisier *et al.*, 1988) was used as a probe.

## **Results and Discussion**

The TEs of *mesophragmatica* group have been poorly studied. In some reports that study the South America populations have included *D. gaucha* representing *mesophragmatica* group (Loreto *et al.*, 1998). The status of the species of *mesophragmatica* group in relation to the presence of the *I*, *hobo*, *Tom/17.6*, *mariner*, *micropia*, *P*, and *gypsy* transposable elements is presented in Table 1.

The absence of *I* element, a non-LTR retrotransposon, in *mesophragmatica* group was expected. This element has its distribution restricted to the *melanogaster* group, which has been reported for others authors (Bucheton *et al.*, 1986, Stacey *et al.*, 1986, Loreto *et al.*, 1998). The

current study has demonstrated that *mesophragmatica* group species studied have not amplified *hobo* homologous sequences. This result might be explained based on its distribution.

The *hobo* element seems to be restricted to species of *melanogaster* and montium subgroups of the *melanogaster* group (Daniels et al., 1990b, Periquet et al., 1994). Boussy and Itoh (2004) have been recently proposed analyzing *D. melanogaster* sequenced genome that all sequences of *hobo* are probably relics of an earlier introduction of *hobo* into the ancestral species. There appear to have been two or three introduction of *hobo* into *melanogaster* subgroup, followed by transfer between extant species. However, Loreto et al. (1998) showed a weak hybridization with the *hobo* probe in some strains of *D. willistoni*, which belong to the other group, suggesting that this transposable element (TE) could have a not so narrow distribution. Out of *Drosophila* genus, *hobo*-like elements have been found in some species of Diptera, like *Musca domestica* (Atkinson et al., 1993) and different tephritids (Handler and Gomez, 1996; Torti et al. 2005) and, also in some species of Lepidoptera (DeVault and Narang, 1994; Borsati et al., 2003). In animals other than insects, *hobo*-like elements have been identified only in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

*Tom/17.6* family was not found in *mesophragmatica* group species studied. Loreto and colleagues (unpublished results) have obtained homologous sequences in subgroup *melanogaster* and *Zaprionus indianus* a non-*Drosophila* genus species.

Using the *D. mauritiana* (MOS1) as probe, no homologous sequences were observed in the studied species. However, Brunet et al., (1994) using degenerated primers to mariner were able to amplify sequences in some *Drosophila* species that was primarily observed as empty to mariner by Southern Blot analysis. Our results using degenerate primers described by Robertson and Macleod (1993) showed that this TE is present in *D. brncici*, *D. viracochi* and *D. gasici*, which had been amplified a fragment smaller than the others around 300pb. *D. pavani* didn't have a positive result for presence of this TE in its genome.

Genomic DNA from all species tested of *mesophragmatica* group hybridized with *micropia* probe. *micropia* is a representative of a family of transposable elements discovered as constituents of the Y-chromosomal fertility genes of *Drosophila hydei* (Henning et al., 1993; Huijser, et al., 1998). Several members of the *micropia* family have subsequently been recovered from *D. melanogaster*. Recently *micropia* was described for species of groups' *saltans*, *parasaltans*, *cordata*, *sturtevantii*, *elliptica* (Almeida et al., 2001).

**Table 1-** Distribution of Transposable Elements in *mesophragmatica* species group

Species	<i>gypsy</i> PCR	<i>P</i> PCR	<i>hobo</i> PCR	<i>17.6/tom</i> PCR	<i>mariner</i> Dot blot	<i>mariner</i> PCR	<i>micropia</i> Dot blot	<i>micropia</i> Dot blot	<i>I</i> Dot blot
<i>D.gasici</i> (Arica)	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>D.gasici</i> (Colombia)	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>D.gasici</i> (Cocha)	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>D.brncici</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>D.pavani</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>D.viracochi</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-

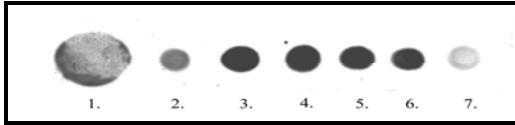


Figure 1- Dot Blot *micropia* element. 1-positive signal, 2-*D. gasici*-Arica, *D.gasici*-Cochabamba, *D. gasici*-Colombia, *D. brncici*, *D. pavani*, *D. viracochi*.

The *P* element family is one of the best investigated TEs. Studies of the distribution of *P*-homologous sequences in the genus *Drosophila* have shown that they are basically confined to the subgenus *Sophophora* (Loreto et al., 1998). Although, according to a great amount of information this mobile sequence may have recently invaded the genome of *Drosophila melanogaster*, probably by horizontal transfer from a species of the *willistoni* group (for review see: Anxobéhère, 1992; Kidwell, 1992, 1994; Engels, 1992; Cummings, 1994; Capy et al. 1994; Clark et al., 1995). Our data have shown that *P* element has amplified homologous sequences, in just two of the species analyzed, *D.gasici* from Colombia; and *D.pavani* (Figures 2 and 3). Nevertheless, this PCR screening of *P* homologous sequences within *mesophragmatica* group is not enough yet to suggest a pattern of distribution in this group or to analyze its presence among them.

*gypsy*, LTR transposon, homologous sequences were present in all species tested (Figure 4). Our finds were expected and related to the presence of this element in different species of *Drosophila* genus (Stacey et al., 1986). Some reports have showed the great capacity of *gypsy* to invade different genomes and its relationship with retrovirus has been inferred in several studies (Xiong and Eickbush, 1990; Kim et al., 1994; Prud'homme et al., 1995; Péliisson et al., 1997; Lerat and Capy, 1999), which may explain its wide distribution.

This screening about presence and distribution of TEs, mainly in the genus *Drosophila*, is a very important tool to corroborate in phylogenetics analyzes involving TEs of Neotropical species. It has already been shown incongruence between TEs and their host phylogenetics trees. Loreto and colleagues (1998, 2001) analyzing the presence of *P* element in Neotropical drosophilids have found this TE in *D. mediopunctata*, which demonstrated a Horizontal Transfer phenomenon involving this TE.

Looking forward, studies about phylogenetic distribution of TEs lead a better understanding of its evolution and influence in the host genome. Heredia et al. (2004) reported a complex evolutionary pattern with phylogenetics relationships inconsistent with those of their host, when analyzed *gypsy* elements from Neotropical species. These data also support that horizontal transfer is shown to be an important feature of the evolutionary history of *gypsy* and others TEs, like *P* element.

This report represents an attempt to describe the distribution of TEs in species of *mesophragmatica* group. Our results allow a phylogenetic analyzes for a *gypsy* retrotransposon

(next chapter) to contribute with another works. The occurrence of the *P* element in *D. gasici* and *D. pavani* represents an important study that still have to be done for these species, as well as for *micropia* element.

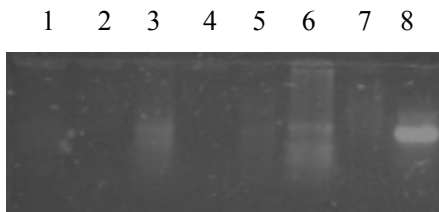


Figure 2- PCR of *P* Transposable Element. 1-*D. gasici*-Arica, 2-*D. gasici*-Cochabamba, 3-*D. gasici*-Colombia, 4-*D. brncici*, 5-*D. pavani*, 6-*D. viracochi*, 7- empty, 8-positive signal.

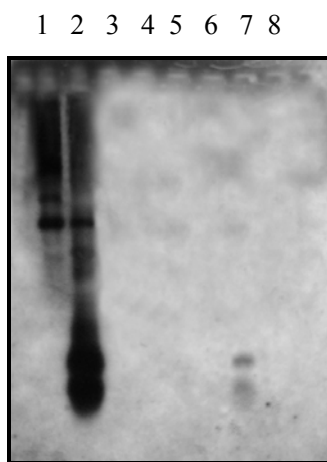


Figure 3- Southern Blot of PCR result of *P* element. 1 and 2- positive signals, 3-*D. gasici*-Arica, 4-*D. gasici*-Cochabamba, 5-*D. gasici*-Colombia, 6-*D. brncici*, 7-*D. pavani*, 8-*D. viracochi*.

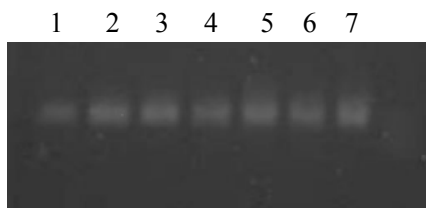


Figure 4- PCR of *gypsy* Transposable Element. 1-positive signals, 2-*D. gasici*-Arica, 3-*D. gasici*-Cochabamba, 4-*D. gasici*-Colombia, 5-*D. brncici*, 6-*D. pavani*, 7-*D. viracochi*.



## Literature Cited

---

ALMEIDA, L. M.; CASTRO, J. P. and CARARETO, C. M. *Micropia* transposable element occurrence in *Drosophila* species of the *saltans* group. **D.I. S.**, v.84, p.114-117, 2001.

ANXOLABÉHÈRE, D. and PERIQUET, G. P-homologous sequences in Diptera are not restricted to the Drosophilidae family. **Genet. Iber.** v.39, p.211-222, 1987.

ANXOLABÉHÈRE, D. L'élément transposable P chez *Drosophila melanogaster*: un transfert horizontal. **C. R. Soc. Biol.**, v. 186, p. 641-655, 1992.

ATKINSON, P.W., WARREN W.D. and O'BROCHTA, D.A. The *hobo* transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises the *Ac* element of maize. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.9693-9697, 1993.

BIÉMONT, C., and G. CIZERON. 1999. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. **Genetica**, v. 105, p.43-62, 1999.

BORSATTI, F.; AZZONI P. and MANDRIOLI, M. Identification of a new *hobo* element in the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). **Hereditas**, v.139, p.151-155, 2003.

BOUSSY, I. A and ITOH, M. Wanderings of hobo: a transposon in *Drosophila melanogaster* and its close relatives. **Genetica**, v 120, p. 125-136, 2004.

BRNCIC, D. A comparative study of chromosomal variation in species of the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. **Genetics**, v.42, p. 789-805, 1957.

BRNCIC, D. and KOREF-SEBASTIÁÑEZ, S. The *mesophragmatica* group species of *Drosophila*. **Evolution**, v.11, p.300-310, 1957.

BRNCIC, D.; PULIYAMPETTA, S.N.; MARSHALL, R.W. Cytotaxonomic relationships within mesophragmatica species group of *Drosophila*. Studies in Genetics VI. **Univ. Texas Publ.**, v.7103, p.1-16, fev.1971.

BRUNET F et al. The mariner transposable element in the Drosophilidae family. **Heredity**, v.73(4), p.377-385, 1994.

BUCHETON, A.; SIMONELIG, M. and CROZATIER, M. Sequences similar to the transposable element involved in I-R hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* occur in the other *Drosophila* species. **Nature**, v.322, p. 650-652, 1986.

CAPY, P.; ANXOLABÉHÈRE, D. and T. LANGIN. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfer the only explanation? **Trends Genet.**, v.10, p.7-12 1994.

CLARK, J. B. et al. Molecular evolution of P transposable element in the genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, p. 902-913, 1995.

CUMMINGS, M. P. Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. **Tree**, v. 9, p. 141-145, 1994.

DANIELS, S. B. et al. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, v.124, p. 339-355, 1990.a

DANIELS, S. B.; CHOVNICK, A. and BOUSSY, I. A. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, p. 589-606, 1990.b

DEVAULT, J.D. and NARANG, S.K. Transposable elements in Lepidoptera: *hobo*-like transposons in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Biochem. Biophys. Res.**, v.203, p.169-175, 1994.

ENGELS, W. R. The origin of P element in *Drosophila melanogaster*. **BioEssays**, v.14 (10), October, 1992.

FAWCETT, D. H.; LISTER, and FINNEGAM. Transposable elements controlling I-R Hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* are similar to mammalian LINES. **Cell.**, v. 47, p. 1007-1015, 1986.

FINNEGAM, D. J.; FAWCETT, D. H. Transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Oxford surveys on eukaryotic genes**, v.3, p.1-62, 1986.

FINNEGAM, D. J. Eukaryotic transposable elements and genoma evolution. **Trends Genetics**, v.5 (4), p.103-107, 1989.

FINNEGAM, D. J. Transposable elements. In: The genome of *Drosophila melanogaster*. D. L. Lindsley, and G. Zimm, eds. **Academic Press**, New York. P. 1092-1107, 1992.

HANDLER, AM. and GOMEZ, S.P. The *hobo* transposable element excises and has related elements in tephritid species. **Genetics**, v.143, p.1339-1347,1996.

HEREDIA, F.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Complex Evolution of *gypsy* in drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v.21 (10), p.1-12, 2004.

HUIISER, P. et al. Retrotransposon-like sequences are expressed in Y chromosomal lampbrush loops of *Drosophila hydei*. **J. Mol. Biol.**, v.203, p. 689-697, 1988.

HUNTER, A. S. and HUNTER, R. A. The *mesophragmatica* species group of *Drosophila* in Colombia. **Ann. Entomo. Soc. Amer.**, v. 57, p. 732-736, 1964.

JOWETT, T. 1986. Preparation of nucleic acids. Pp. 275-286 in D. B. Roberts, ed. *Drosophila: a practical approach*. **IRL Press**, Washington, D.C.

KIDWELL, M. G. Horizontal transfer of *P* elements and other short repeat trasnposons. **Genetica**, v.86, p. 275-286, 1992.

KIDWELL, M. G. The evolutionary history of P family of transposable elements. **Journal of heredity**, v. 85, p. 339-346, 1994.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. Transposable elements as a sources of variation in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p. 7704-7711, 1997.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. Transposable elements and host genome evolution. **Trends Ecol. Evol.**, v.15, p. 95-99, 2000.

KIM, A., C. et al. Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *D. melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p.1285–1289, 1994.

LEE S. H.; CLARK J. B.; KIDWELL M. G. A P element homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. **Insect Mol. Biol.**, v.8 (4), p.491-500, 1999.

LERAT, E.; P. CAPY. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, p. 1198–1207.1999.

LORETO, E. L.; et. al. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. **Genetica.**, v.101, p.153–165. 1998.

LORETO, E. L.; et al. *Drosophila mediopunctata* P elements: a new example of horizontal transfer. **The Journal of Heredity**, v.92, v. 375-381, 2001.

MARUYAMA, K. HARTL, D. L. Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species. **Genetics**, v.128, p. 319-329, 1991.

PÉLISSON, A. et. al. About the origin of retrovirus and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus in *Drosophila flamenco* host gene. **Genetica**, v.100, p. 29-37, 1997.

PERIQUET, G. et al. The evolutionary genetics of the hobo transposable element in the *Drosophila melanogaster* complex. **Genetica**, v. 93, p. 79-90, 1994.

PRUD'HOMME, N. et al. *Flamenco*, a gene controlling the gypsyretrovirus of *D. melanogaster*. **Genetics**, v.139, p.697–711, 1995.

ROBERTSON and MACLEOD. Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. **Insect Mol. Biol.**, 2 (3): 125-39, 1993.

STACEY, S. N. et al. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v.3, p.522-534, 1986.

TORTI, C. et al. *Cchobo*, a *hobo*-related sequence in *Ceratitis capitata*. **Genetica** XXXXX.2005

XIONG, Y., and T. H. EICKBUSH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. **EMBO J.**, v.9, p.3353–3362, 1990.

YODER, J. A. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **TIG**.v.13 (8), p.335-340, 1997.

## Capítulo 2

---

### Evolution of *gypsy-like* sequences in species of *mesophragmatica* group of *Drosophila*

**Germanos, Erika.** (Curso de mestrado em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil).

**Loreto, Élgion da S. L.** (Curso de mestrado em Biodiversidade Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria-RS).

\*Trabalho a ser enviado para a revista Heredity

## Abstract

*gypsy* is a retrotransposon of *Drosophila melanogaster* belonging to the superfamily *Ty3/gypsy* of retrotransposable elements. These are the most abundant type of TEs, long terminal repeats (LTR) retrotransposons, in *Drosophila*. They are widely distributed among eukaryotes and closely related to retrovirus. There are some reports showing clearly the absence of congruence between *gypsy* and *Drosophila* phylogenies. The main focus of this report is to investigate the retrotransposon *gypsy* within *mesophragmatica* group of *Drosophila*. The question of how TEs could have evolved in this group is a challenge yet. Those species are a very interesting model for research because of their ecological and geographically endemic characteristics. Although, there are just a few reports addressing molecular studies to *mesophragmatica* group. A total of 15 sequences of 4 species of *mesophragmatica* group and also 22 sequences from 21 species obtained from literature have been used to establish a phylogenetic inference. A complex divergence pattern and incongruence between element and host phylogeny including the possibility of horizontal transfer events pointed to a more complex evolutionary scenario, which seems to corroborate our finds with others studies.

**Keywords:** *mesophragmatica*, *Drosophila*, *gypsy*, evolution, genome, phylogeny.

## Introduction

Eucaryotic transposable elements (TEs) often make up substantial fraction of the host genome in which they reside. *gypsy* is a retrotransposon of *Drosophila melanogaster* belonging to the superfamily *Ty3/gypsy* of retrotransposable elements. These are the most abundant type of TEs, long terminal repeats (LTR) retrotransposons, in *Drosophila*. They are widely distributed among eukaryotes and closely related to retrovirus, which has been reported in several studies (Kim et al, 1994; Pélisson et al, 1997; Lerat and Capy 1999). For its molecular organization allows referred to as Metaviridae according to virus taxonomy (Boeke et al., 2000).

The most of *gypsy* elements found in *D. melanogaster* are defective and, or heterochromatin elements that do not transpose. The genetic basis for the regulation of *gypsy* activity in *D. melanogaster* is now well known, and it has been assigned to an X-linked gene called *flamenco* (Prud'homme et al., 1995, Pélisson et al., 1997).

Sequences homologous to *gypsy* from *D. melanogaster* are distributed throughout *Drosophila* species. Southern blot hybridization signals have been detected in most of the analyzed species belonging to *Sophophora* and *Drosophila* subgenera (De Frutos et al., 1992; Loreto et al. 1998). The widespread presence of *gypsy*-like sequences suggests the existence of ancestral elements in the genomes of *Drosophila* species before early radiations (Alberola and De Frutos, 1996).

The infectious properties of *gypsy* may result from the expression of the *envelope* (*env*) gene and the ability to invade the genome of a new species is conditioned by its capacity to be expressed in the naive genome (Teyssset et al., 1998; Mejlumian et al., 2002).

There are some reports showing clearly the absence of congruence between *gypsy* and *Drosophila* phylogenies. Nevertheless, it seems reasonable assume that copies with different levels of activity might evolve at different rates (Capy et al., 1998). The evolutionary dynamic of *gypsy* transposable element is supported by different mechanism playing different roles like vertical and horizontal transmission, stochastic loss suggesting a complex pattern of evolution (Terzian et al., 2000; Mejlumian et al., 2002; Heredia et al., 2004).

The *mesophragmatica* group of *Drosophila* is probably the most typical cluster of species occurring almost exclusively in the Andes system of mountains (Brncic et al., 1971). Cytotaxonomic relationships within the *mesophragmatica* group have been reported but actually rare phylogenetics studies reached the group. The investigations correlated their geographical



distribution; some of the species live at high altitudes over 10,000 feet, with some peculiar genetics characteristics like chromosomal polymorphisms (Brcic, 1958; Brcic and Koref-Santibañez, 1957; Brcic, 1957).

In this context, the main focus of this report is to investigate the retrotransposon *gypsy* within *mesophragmatica* group of *Drosophila*. The question of how TEs could have evolved in this group is a challenge yet. Those species are a very interesting model for research because of their ecological and geographically endemic characteristics. Although, there are just a few reports addressing molecular studies to *mesophragmatica* group (Robe *et al.*, 2005). In attempt to increase the knowledge about how the retrotransposon *gypsy* has been evolved, especially in this group, we performed a phylogenetic analysis. The *gypsy* homologous sequences were investigated in four species of the *mesophragmatica* group and also some more 19 species obtained from Heredia *et al.* (2004) were utilized to construct the tree topology. The data corroborate the complex evolution pattern for the retroelement *gypsy* as hypothesized by others investigators.

## Material & Methods

### *Drosophila Stocks*

The species of mesophragmatica group studied were were *D. pavani* (La Florida-Chile); *D. viracochi* (Colombia); *D. brncici* (Colombia) and *D. gasici* (Arica-Chile). The stocks were maintained in standard cornmeal medium at constant temperature and humidity (20°C +/- 2°C; 60% r. h).

### *PCR Amplification, Cloning and Sequencing*

Genomic DNA was prepared from approximately 100 adults flies per sample and was extracted according to Jowett (1986) with some adjust. The pair of degenerated primers used to amplify *gypsy* in genomic DNA from all species were: GYP3S2 5' AAAGGCGAYTTGGTTGACTCC3'; and GYP3AS2 5'CARGTGGCTRGTTGRGTGTG 3', described by Heredia *et al* (2004), as well as the reaction used for the amplification.

The amplified fragment obtained was cloned into a TA cloning vector (Introgen®). DNA sequencing was performed directly in a MegaBACE 500 automatic sequencer. The dideoxi chain-

termination reaction was implemented with the use of the DYEnamic ET® kit (Bioscience). The sequences were then submitted to a “confidence consensus” analysis using the Staden Package Gap 4 programme (Staden, 1996). The reads had been done for each clone of *mesophragmatica* species until the high quality consensus sequence was obtained. BLAST analyses were performed using GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) to look for sequences with general similarity. The resultant sequences were aligned using Clustal W programme (Thompson et al., 1994).

### ***Phylogenetic Analyses***

The phylogenetic analyses were carried out using MEGA2 programme (Kumar et al., 2000). The methods utilized for tree inference were maximum parsimony and neighbor-joining. For maximum parsimony we applied the Close-neighbor-interchange (CNI) method, level 3 and 10 sampling for “Random addition tree” option, while Kimura 2-parameters distances were used for Neighbor-joining analyses. The trees topologies were statistically tested by bootstrap (1000 replicates) to assess the support for each internal branch of the trees. The topologies for both methods gave similar results. The sequences of the amplified *gypsy*-homologous sequences have been deposited under accession numbers: AY861688-AY861700. All others *Drosophila* species, *Zaprionus indianus* and *Scaptodrosophila latifasciaeformis* sequences were the same as employed in Heredia *et al.*, (2004).

### **Results**

The PCR products that were cloned and sequenced from species of *mesophragmatica* group showed a length around 490 base pair. At least four clones of each species were sequenced, except for *D. viracochi* that has had just three clones. A total of 15 sequences of 4 species of *mesophragmatica* group and also 22 sequences from 21 species obtained from literature have been used to establish a phylogenetic inference. The sequences employed from literature were selected since represent each one of 8 clades proposed by Heredia *et al.*, (2004) in a phylogenetic analysis of *gypsy env* gene. We intent, by this way, correlate the *gypsy*-like sequences founded in the *mesophragmatica* species with that one previously described to *Drosophila* genus.

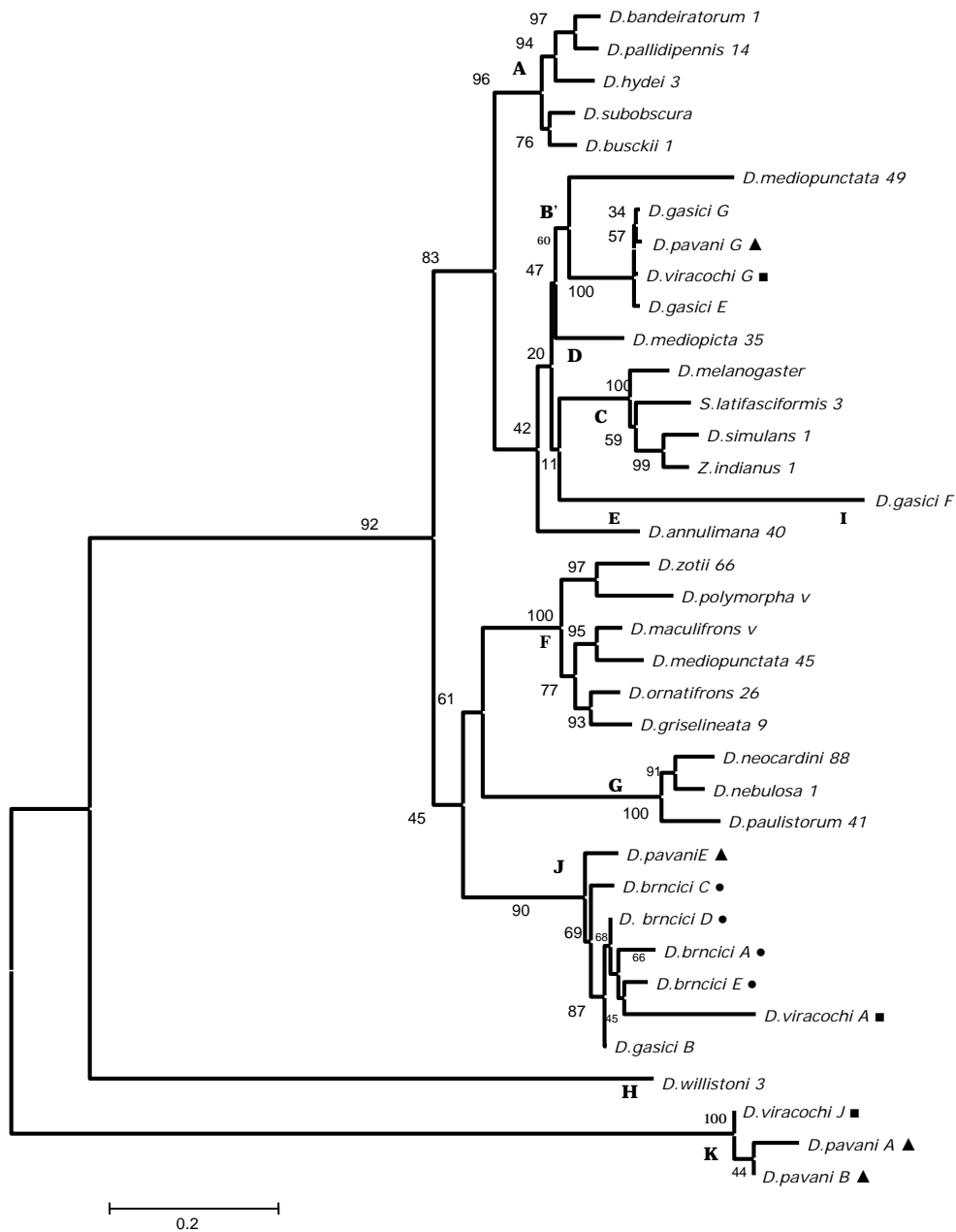
The phylogenies obtained (by both Neighbor-Joining an Maximum Parsimony methods) from the analysis of *gypsy* homologous sequences resulted in very similar topologies. The

Neighbor-Joining tree (Fig.1) consists of six clades. Previous analyses without *mesophragmatica* group species has been found those clades subdivided in 8 group named by letters A to H according to Heredia et al. (2004). We considered the same groups established by the authors and depict that three new groups have been formed once the *mesophragmatica gypsy* sequences were included in the analysis. These three new groups are formed exclusively with *gypsy* sequences of species from *mesophragmatica* group and were denominated I, J and K (Fig.1).

In our analyses four *mesophragmatica gypsy* sequences were included in the cluster B from Heredia et al. (2004) once presents divergence smaller than 20% from sequences that form the B group. In that analysis this cluster was formed by sequences from *D. mediosignata* and *D. mediopunctata* that belongs to *tripunctata* group. The *mesophragmatica'* sequences that were included in this cluster were *D. gasici* E, *D. gasici* G, *D. pavani* G, *D. viracochi* G. Nevertheless, the inclusion of these new sequences to the B cluster from Heredia et al. (2004) we propose designed this new cluster B'. One fact that calls attention in these sequences is the high similarity among them. The estimated divergence using Kimura-2-parameters was only 0.01 (table 1). Also, these sequences appear maintain the coding potential. In two of these four sequences do not occur stop codons preserving intact the *env gypsy* open reading frame. The protein Blast search using the putative protein as query sequence results as a better hits a putative retrovirus-like *env* glycoprotein from *Drosophila simulans* with 92% similarity and, as second one, the retrotransposon *gypsy env* polyprotein from *Drosophila melanogaster* with 91% similarity.

The group I is formed for only one sequence (*D. gasici* – clone F). This sequence is more correlated with *gypsy* sequences from group C formed by sequences from *D. melanogaster*, *D. simulans*, *Zaprionus indianus* and *Scaptodrosophila latifasciformes*. However, *D. gasici* F sequence was considered as distinct group because the degrees of divergence are higher than 20% from that the group C. The analysis of coding potential of this sequence shows a high degenerated sequence with 12 stop codons and indels.

We have obtained a new group J that is formed just for *mesophragmatica* sequences; *D. brncici* – clone A, *D. brncici* – clone C, *D. brncici*– clone D, *D. brncici* – clone E, *D. pavani* – clone E and *D. viracochi* – clone A. This cluster is more correlated to other two groups of *gypsy* sequences that form clusters F (*D. zotii*, *D. polymorpha*, *D. maculifrons*, *D. mediopunctata*,



**Fig.1-** Phylogenetic analyses of *gypsy-like* sequences. Neighbor-joining three with Kimura two-parameter distances. The numbers are bootstrap values based on 1000 replications. Clone letter follows the species names (*mesophragmatica* group) representing the sequences of each species. Different symbols (●, ▲ and ■) represent distinct families of *gypsy-like* sequences.

**Table 1-** Distances (Kimura's two-Parameter method) of *mesophragmatica* species sequences

	Group B' *			Group I			Group J #					Group K ●			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1- <i>D. viracochi</i> G*															
2- <i>D. gasici</i> G*	0.009														
3- <i>D. pavani</i> G*	0.011	0.012													
4- <i>D. gasici</i> E*	0.012	0.015	0.019												
5- <i>D. gasici</i> F	0.394	0.402	0.402	0.395											
6- <i>D. brncici</i> E#	0.495	0.495	0.490	0.489	0.580										
7- <i>D. viracochi</i> A#	0.645	0.623	0.638	0.649	0.759	0.185									
8- <i>D. brncici</i> D#	0.437	0.435	0.433	0.456	0.543	0.044	0.180								
9- <i>D. gasici</i> B#	0.427	0.427	0.423	0.446	0.547	0.053	0.176	0.009							
10- <i>D. brncici</i> A#	0.499	0.494	0.494	0.521	0.591	0.079	0.208	0.047	0.057						
11- <i>D. brncici</i> C#	0.438	0.433	0.433	0.460	0.544	0.093	0.222	0.049	0.049	0.090					
12- <i>D. pavani</i> E#	0.444	0.442	0.440	0.458	0.574	0.117	0.234	0.069	0.068	0.113	0.076				
13- <i>D. viracochi</i> J●	1.606	1.559	1.547	1.513	2.468	1.509	1.330	1.596	1.552	1.743	1.462	1.618			
14- <i>D. pavani</i> A●	1.753	1.690	1.699	1.540	2.322	1.533	1.331	1.585	1.539	1.739	1.487	1.521	0.044		
15- <i>D. pavani</i> B●	1.890	1.510	1.533	1.506	2.271	1.571	1.406	1.626	1.578	1.762	1.495	1.597	0.048	0.050	

*D. ornatifrons*, *D. griselineata*) and G (*D. neocardini*, *D. nebulosa*, *D. paulistorum*). The average degree of divergence between these groups and J group is respectively 40.3%, and 51.4%. The protein Blast search using the putative protein as query sequence showed high degenerated sequences varying between 9 and 15 stop codons. Although there is significant similarity around 20 nucleotides, as a better hit a putative retrovirus-like *env* glycoprotein from *Drosophila simulans*, the retrotransposon *gypsy env* polyprotein from *Drosophila melanogaster* and putative retrovirus-like *env* glycoprotein from *Drosophila teissieri* with 85% similarity.

The sequences of *mesophragmatica* species *D. viracochi* - clone J, *D. pavani* - clone A, *D. pavani* - clone B form the cluster K. The percent difference found among them is between 4 and 5 %. Nevertheless when compared to all the others sequences have showed a very high degree of divergence (Table 1). The sequences of this cluster were the most different from the remaining samples. These sequences were very degenerated showing 5 to 11 stop codons and indels.

## **Discussion**

*gypsy* is a retrotransposon widely distributed among living organisms (Miller et al. 1999; Márin and Lloréns, 2000). The studies about *gypsy* in *Drosophila* have shown the extensive presence of these sequences in the genus. Heredia et al (2004) have demonstrated a very high diversification of *gypsy*-like sequences among drosophilids. Homologous sequences to *gypsy* in this genus have been attributed to its presence in ancestral genomes, before the separation of the main radiation branches with further expansion by vertical transmission (Alberola and De Frutos, 1996). A complex divergence pattern and incongruence between element and host phylogeny including the possibility of horizontal transfer events pointed to a more complex evolutionary scenario, which seems to corroborate our finds with others studies (Stacey et al. 1986; De frutos et al. 1992; Terzian et al. 2000; Mejlumian et al.2002; Heredia et al. 2004)

The data available about *gypsy* have shown a very high number of different families found in the species genome. The distances obtained between clusters as B' and J suggests the existence of multiple families of *gypsy* in our investigation. Tubio et al. (2004) have described known and novel retrotransposons belonging to the *Ty3/gypsy* group in the sequenced genome of *Anopheles gambiae*. As described in Kaminker et al. (2002) there are at least six different families of *gypsy* in

*D. melanogaster* genome. In accordance to these findings we have identified three putative lineages in the genome of *D. viracochi* and *D. pavani* of *mesophragmatica* group showing that there are more than one lineage in the genome of a species. For gypsy, the coexistence of multiple families in the same genome have been investigated by others authors (Alberola and De frutos 1996; Hochstenbach et al. 1996; Terzian et al. 2000; Vázquez-Marinque et al. 2000; Martínez-Sebastián et al. 2002; Heredia et al. 2004).

The wide distribution of class I transposable elements usually has been associated by the existence of this mobile sequences in the ancestral species. The authors concluded that vertical transmission was the main mechanism responsible for this spread. An element such as gypsy has showed more complex divergence pattern, where phylogenetic relations of the host genome are not compatible with the element phylogeny. This kind of evidence seems to be explained by the horizontal transmission hypothesis, which has been inferred in other studies (Heredia et al. 2004).

The presence of multiple lineages of gypsy mobile element could be as a result of a large number of infections once gypsy is considered as a retrovirus? Our data suggests horizontal transmission for the sequences of cluster B' when analyses the sequences of *mesophragmatica* group. The divergence of gypsy sequences is smaller than observed for *Amd* gene (Hobe et al. 2005), which is not expected for a mobile element. Nevertheless, the *env* gene is more conserved still showing that is active or should have been activated a short time ago (Table 2).

The high divergence found among gypsy sequences of clusters J and K reveal a vertical transmission pattern (Table 1). However, we cannot discard the presence in *D. brncici* and *D. gasici* of these gypsy-like sequences found in cluster B'. This absence could be associated to a stochastic loss event or the sequences were might not detected in our analyses by sampling error. Another analyses of more clones should be done to verify the sample.

This report aimed to gain more evidences into the evolutionary history of mobile element gypsy. An extremely complex pattern of evolution could be evocated to explain our findings. The different phenomena like vertical transmission, horizontal transmission, different evolutionary rate, and ancestral polymorphism are not mutually exclusive and might occur simultaneously.

**Table 2-** Comparative analyses between genetic distances (Kimura's Two-Parameter Method) of *Amd* sequences and *gypsy* sequences of cluster B'.

	1		2		3		4	
	<b>D. viracochi</b>		<i>D. gasici</i>		<i>D. pavani</i>		<b>D. gasici</b>	
	<i>gypsyG</i>	<i>Amd</i>	<i>gypsyG</i>	<i>Amd</i>	<i>gypsyG</i>	<i>Amd</i>	<i>gypsyE</i>	<i>Amd</i>
1								
2	0.009	0.050						
3	0.011	0.040	0.015	0.030				
4	0.012	0.050	0.012	*	0.019	0.030		



## Literature Cited

---

ALBEROLA, T. M.; DE FRUTOS, R. Molecular structure of a *gypsy* element of *D.subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. **Nucleic Acids Res.**, v.24, p.914–923, 1996.

BOEKE, J. D. et al. **Metaviridae**. In: in Virus Taxonomy: ICTV VIIth Report Edited by Murphy FA. New York:Springer-Verlag, 2000.

BRNCIC, D. A comparative study of chromosomal variation in species of the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. **Genetics**, v.42, p. 789-805, 1957.

BRNCIC, D. & KOREF-SEBASTIÁÑEZ, S. The *mesophragmatica* group species of *Drosophila*. **Evolution**, v.11, p.300-310, 1957.

BRNCIC, D. The *mesophragmatica* group as an example of speciation phenomena in *Drosophila*. **Proceeding of the X international congress of genetics**, Canada, v. I, p.420-433, 1958.

BRNCIC, D.; PULIYAMPETTA, S.N.; MARSHALL, R.W. Cytotaxonomic relationships within *mesophragmatica* species group of *Drosophila*. Studies in Genetics VI. **Univ. Texas Publ.**, v.7103, p.1-16, fev, 1971.

CAPY, P. et al. Dynamics and evolution of transposable elements. **Landes Biosciense**, Austin, Texas, 1998.

DE FRUTOS, R.; PETERSON, K. R.; M. G. KIDWELL. Distribution of *D. melanogaster* transposable element sequences in species of the *obscura* group. **Chromosoma**, v.101, p.293–300, 1992.

HEREDIA, F.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Complex Evolution of *gypsy* in drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v.21 (10), p.1-12, 2004.

HOCHSTENBACH, R. et al. Transcription of *gypsy* elements in a Y-chromosome male fertility gene of *D. hydei*. **Genetics**, v.142, p.437-446, 1996.

JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. Pp. 275-286 in D. B. Roberts, ed. *Drosophila: a practical approach*. **IRL Press**, Washington, D.C. 1986.

KAMINKER, J. S. et al. The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. **Genome Biol.**, v.3, research0084.1-0084.2, 2002.

KIM, A., C. et al. Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *D. melanogaster*. **Proc. Natl. Acad.Sci.**, v.91, p.1285–1289, 1994.

KUMAR, S.; Tamura, K.I.; Nei, M. MEGA@: molecular Evolutionary Genetic Analyses, version 2.0. Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, Arizona, 2000.

LERAT, E.; CAPY, P. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, p.1198–1207, 1999.

LORETO, E. L. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. **Genetica**, v.101, p.153–165, 1998.

MARÍN, I; LIORÉNS, C. *Ty31 Gypsy* retrotransposon: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p.104-1049, 2000.

MARTINEZ- SEBASTIÁN, M. J. et al. Evolutionary patterns of the *gypsy* and *bilbo* retrotransposon families in the *Drosophila* species of the *obscura* group. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.25, p. 254-266, 2002.

MEJLUMIAN, L. et al. Comparative and functional studies of drosophila species invasion by the *gypsy* endogenous retrovirus. **Genetics**, v.160, p.201-209, 2002.

MILLER, K. C. et al. Identification of multiple *gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. **J. Mol. Evol.**, v.33, p.358-366, 1999.

PÉLISSON, A., L. et al. About the origin of retroviruses and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. *Genetica*, v.100, p. 29-37, 1997.

PRUD'HOMME, N., M. *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy*retrovirus of *D. melanogaster*. **Genetics**, v.139, p.697-711, 1995.

ROBE, L. J. et al. Molecular Phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on the Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol. Phylogenet. Evol.** *In press*, 2005.

STACEY, S. N. et al. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v.3, p.522-534, 1986.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol**, v.5, p.233-241,1996.

TERZIAN, C. et al. Evolution of the *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Mol. Biol. Evol**, v.17, p.908-914,2000.

TEYSSET, L., et al. A Moloney murine leukemia virus-based retroviral vector pseudotyped by the insect retroviral *gypsy* envelope can infect *Drosophila* cells. **J. Virol**, v.72, p.853-856,1998.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TUBÍO, J. M.; NAVEIRA, H.; COSTAS, J. Structural and Evolutionary analyses of the TY3/gypsy group of LTR transposons in the genome of *Anopheles gambiae*. **Mol. Biol. Evol.**2004.

VÁZQUEZ-MANRIQUE, R. P. et al. Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p. 1185-1193, 2000.

## Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas

---

Inúmeras pesquisas envolvendo a variedade e a distribuição dos Elementos Transponíveis já foram realizadas em populações naturais e de laboratório. Os resultados mostram que existe um alto grau de sofisticação no comportamento dos TEs, previamente inimaginável. Existem vários exemplos de mutações e outros tipos de variações ocorridas no genoma associadas com a atividade dos elementos transponíveis. Desde fenótipos mutantes até mudanças sutis em tecidos específicos, a dramáticas alterações no desenvolvimento e organização de órgãos. Estas variações, analisadas numa perspectiva evolutiva, podem ser resultado da natureza dos TEs, tais como: 1)comportar-se como um parasita, em alguns casos; 2)possíveis co-adaptações entre estas seqüências móveis e seus hospedeiros que evoluíram para driblar a seleção; ou ainda 3) para minimizar os efeitos deletérios de novas inserções no “*fitness*” do genoma hospedeiro.

Algumas questões ainda não foram respondidas. Sabe-se, hoje, que os TEs possuem um papel importante no processo evolutivo, porém dúvidas ainda giram em torno da natureza da relação entre estas seqüências genéticas móveis e seus hospedeiros. Baseado neste contexto o nosso estudo teve o intuito de contribuir com a análise da presença dos TEs nos genomas das espécies do grupo *mesophragmatica* do gênero *Drosophila* além de analisar a filogenia construída a partir das seqüências do elemento *gypsy*.

O estudo da distribuição dos elementos transponíveis principalmente em espécies do gênero *Drosophila* funciona como uma importante ferramenta para análises filogenéticas envolvendo espécies Neotropicais. A distribuição filogenética dos TEs é importante para a compreensão da evolução e influência destas seqüências móveis dentro do genoma hospedeiro. Nossos resultados mostram mais uma vez que existe um padrão complexo de evolução no cenário evolutivo dos elementos de transposição.

Neste contexto em que a evolução é compreendida como sendo formada por uma série de fatores que não são mutuamente excludentes a transmissão horizontal tem papel importante na evolução dos seres. Atualmente este fenômeno é comprovado como mais freqüente do que se pensava há alguns anos atrás. Assim pode-se dizer que os elementos de transposição com suas características e funcionamento próprio figuram como meio de troca genética eficaz.

Características ecológicas dos drosofilídeos podem propiciar uma maior interação com organismos como ácaros, parasitóides, e microorganismos que funcionem como vetores para a transmissão horizontal. Como já foi estudado por outros pesquisadores. Porém é importante ressaltar que a transmissão horizontal deve ser vista com cautela uma vez que alguns estudos já remetem para a idéia de que genes que são muito conservados podem não ser apenas uma questão de ancestralidade.

Nossos resultados representam apenas uma pequena contribuição para o entendimento de questões que envolvem filogenia e TEs. Uma análise mais detalhada e a expansão deste estudo envolvendo espécies que ainda não foram estudadas poderiam ajudar a elucidar questões relacionadas às incongruências encontradas entre as filogenias de TEs e seus hospedeiros.

## Referências Bibliográficas

---

ALBEROLA, T. M.; DE FRUTOS, R. Molecular structure of a *gypsy* element of *D.subobscura* (*gypsyDs*) constituting a degenerate form of insect retroviruses. **Nucleic Acids Res.**, v.24. p.914–923,1996.

ALMEIDA, L. M.; CASTRO, J. P. and CARARETO, C. M. *Micropia* transposable element occurrence in *Drosophila* species of the *saltans* group. **D.I. S.**, v.84, p.114-117, 2001.

ANXOLABÉHÈRE, D. and PERIQUET, G. P-homologous sequences in Diptera are not restricted to the Drosophilidae family. **Genet. Iber.**v.39, p.211-222, 1987.

ANXOLABÉHÈRE, D. L'élément transposable P chez *Drosophila melanogaster*: um transfer horizontal. **C. R. Soc. Biol.**, v. 186, p. 641-655, 1992.

ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J. N. **The genetics and biology of Drosophila**. New York: Academic Press, p.395-409, 1986.

ATKINSON, P.W., WARREN W.D. and O'BROCHTA, D.A. The *hobo* transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises the *Ac* element of maize. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.9693-9697, 1993.

BERG, D. & HOWE, M. M. **Mobile DNA**. USA: American Society for Microbiology. 972p., 1989.

BIÉMONT C. Population genetics transposable DNA elements: a *Drosophila* point of view. **Genetica**, v.86, p.68-84, 1992.

BIÉMONT, C., and G. CIZERON. 1999. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species. **Genetica**,v. 105, p.43–62, 1999.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. and LEPETIT, D. Transposable elements and genome evolution: the case of *Drosophila simulans*. **Genetica**, v. 107, p. 113-120, 199.

BOEKE JD et al. **Metaviridae**. In: in Virus Taxonomy: ICTV VIIth Report Edited by Murphy FA. New York:Springer-Verlag, 2000.

BORSATTI, F.; AZZONI P. and MANDRIOLI, M. Identification of a new *hobo* element in the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). **Hereditas**, v.139, p.151-155, 2003.

BOUSSY, I. A and ITOH, M. Wanderings of hobo: a transposon in *Drosophila melanogaster* and its close relatives. **Genetica**, v 120, p. 125-136, 2004.

BRNCIC, D. A comparative study of chromosomal variation in species of the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. **Genetics**, v.42, p. 789-805, 1957.

BRNCIC, D. and KOREF-SEBASTIÁÑEZ, S. The *mesophragmatica* group species of *Drosophila*. **Evolution**, v.11, p.300-310, 1957.

BRNCIC, D. The mesophragmatica group as an example of speciation phenomena in *Drosophila*. **Proceeding of the X international congress of genetics**, Canada, v. I, p.420-433, 1958.

BRNCIC, D.; PULIYAMPETTA, S.N.; MARSHALL, R.W. Cytotaxonomic relationships within mesophragmatica species group of *Drosophila*. Studies in Genetics VI. **Univ. Texas Publ.**, v.7103, p.1-16, fev.1971.

BRUNET F et al. The mariner transposable element in the Drosophilidae family. **Heredity**, v.73(4), p.377-385, 1994.

BUCHETON, A.; SIMONELIG, M. and CROZATIER, M. Sequences similar to the transposable element involved in I-R hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* occur in the other *Drosophila* species. **Nature**, v.322, p. 650-652, 1986.

CAPY, P.; ANXOLABÉHÈRE, D. and T. LANGIN. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfer the only explanation? **Trends Genet.**, v.10, p.7-12 1994.



CAPY, P.; BAZIN, C.; HIGUET, D. and LANGIN, T. Dynamics and evolution of transposable elements. **Landes Biosciense**, Austin, Texas, 1998.

CAPY, P. et al. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity**, v.85, p. 101-106, 2000.

CLARK, J. B. et al. Molecular evolution of P transposable element in the genus *Drosophila*. I. The *saltans* and *willistoni* species groups. **Mol. Biol. Evol.**, v. 12, p. 902-913, 1995.

CLARK, J. B.; KIDWELL, M. G. A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 11428-11433, 1997

CHANDLER, V.; WALBOT, V. DNA modification of maize transposable element correlates with loss of activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1767-1771, 1986.

COATES, C.; et al. The transposable element mariner can excise in non-drosophilid insects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 249, p. 246-252, 1995.

CUMMINGS, M. P. Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. **Tree**, v. 9, p. 141-145, 1994.

DANIELS, S. B. et al. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, v.124, p. 339-355, 1990.a

DANIELS, S. B.; CHOVNICK, A. and BOUSSY, I. A. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, p. 589-606, 1990.b

DE FRUTOS, R.; PETERSON K. R.; M. G. KIDWELL. Distribution of *D. melanogaster* transposable element sequences in species of the *obscura* group. **Chromosoma**, v.101, p.293-300, 1992.

DESMOND, A.; MOORE, J. **Darwin: a vida de um evolucionista atormentado**. Ed. Geração, 2ªed. 1995. p.796.

DeSALLE, R. The phylogenetic relationships of flies in the Family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.1, p. 31-40, 1992.

DEVAULT, J.D. and NARANG, S.K. Transposable elements in Lepidoptera: *hobo*-like transposons in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Biochem. Biophys. Res.**, v.203, p.169-175, 1994.

DUDA, O. Die Sudamerikanischen Drosophilidenunter Berücksichtigung auch der anderen Neotropischen sowie Nearktischen Arten. Arch. Naturgesch., v.91, p. 1-229, In: BRNCIC, D. & KOREF-SEBASTIÁÑEZ, S. The *mesophragmatica* group species of *Drosophila*. **Evolution**, v.11, p.300-310, 1957.

ENGELS, W. R. The origin of *P* element in *Drosophila melanogaster*. **BioEssays**, v.14 (10), October, 1992.

FAWCETT, D. H.; LISTER, and FINNEGAM. Transposable elements controlling I-R Hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* are similar to mammalian LINEs. **Cell.**, v. 47, p. 1007-1015, 1986.

FINNEGAM, D. J.; FAWCETT, D. H. Transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Oxford surveys on eukaryotic genes**, v.3, p.1-62, 1986.

FINNEGAM, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics**, v.5 (4), p.103-107, 1989.

FINNEGAM, D. J. Transposable elements. In: The genome of *Drosophila melanogaster*. D. L. Lindsley, and G. Zimm, eds. **Academic Press**, New York. P. 1092-1107, 1992.

GRIMALDI, A. D. A phylogenetic, revised classification of genera in Drosophilidae (Diptera). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** v.197, p1-139. 1990.

HANDLER, AM. and GOMEZ, S.P. The *hobo* transposable element excises and has related elements in tephritid species. **Genetics**, v.143, p.1339-1347,1996.

HEREDIA, F.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Complex Evolution of *gypsy* in drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v.21 (10), p.1-12, 2004.

HICKEY, D. A. 1982. Selfish DNA: a sexually- transmitted nuclear parasite. **Genetics**, v.101, p.519-531, 1982.

HOCHSTENBACH, R. et al. Transcription of *gypsy* elements in a Y-chromosome male fertility gene of *D. hydei*. **Genetics**, v.142, p.437-446, 1996.

HUIISER, P. et al. Retrotransposon-like sequences are expressed in Y chromosomal lampbrush loops of *Drosophila hydei*. **J. Mol. Biol.**, v.203, p. 689-697, 1988.

HUNTER, A. S. and HUNTER, R. A. The *mesophragmatica* species group of *Drosophila* in Colombia. **Ann. Entomo. Soc. Amer.**, v. 57, p. 732-736, 1964.

JAEGER, C. P.; SALZANO, F. M. *Drosophila gaucha*, a new species from Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.13, p. 205-208, 1953.

JOWETT, T. 1986. Preparation of nucleic acids. Pp. 275-286 in D. B. Roberts, ed. *Drosophila: a practical approach*. **IRL Press**, Washington, D.C.

KAMINKER, J. S. et al. The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. **Genome Biol.**, v.3, research0084.1-0084.2, 1995.

KIDWELL, M. G. Horizontal transfer of *P* elements and other short repeat transposons. **Genetica**, v.86, p. 275-286, 1992.

KIDWELL, M. G. The evolutionary history of P family of transposable elements. **Journal of heredity**, v. 85, p. 339-346, 1994.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. Transposable elements as a sources of variation in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p. 7704-7711, 1997.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. Transposable elements and host genome evolution. **Trends Ecol. Evol.**, v.15, p. 95-99, 2000.

KIM, A., C. et al. Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *D. melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p.1285–1289, 1994.

KUMAR, S. K.; Tamura, I.; NEI, M. MEGA@: molecular Evolutionary Genetic Analyses, version 2.0. Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, Arizona.2000.

KWIATOWSKI, J.; AYALA, F. J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.13, p. 319-328. 1999.

LEE S. H.; CLARK J. B.; KIDWELL M. G. A *P* element homologous sequence in the house fly, *Musca domestica*. **Insect Mol. Biol.**, v.8 (4), p.491-500, 1999.

LERAT, E.; P. CAPY. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, p. 1198–1207.1999.

LORETO, E. L.; et. al. Distribution of transposable elements in neotropical species of *Drosophila*. **Genetica.**, v.101, p.153–165. 1998.

LORETO, E. L.; et al. *Drosophila mediopunctata* *P* elements: a new example of horizontal transfer. **The Journal of Heredity**, v.92, v. 375-381, 2001.

MARÍN, I; LIORÉNS, C. *Ty31 Gypsy* retrotransposon: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p.104-1049, 2000.

MCDONALD, J. F. Transposable elements: possible catalysts of organismic evolution. **Trends Ecol. Evol.**, v.10, p. 123-126, 1995.

MARTINEZ- SEBASTIÁN, M. J. et al. Evolutionary patterns of the *gypsy* and *bilbo* retrotransposon families in the *Drosophila* species of the *obscura* group. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.25, p. 254-266, 2002.

MARUYAMA, K. HARTL, D. L. Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species. **Genetics**, v.128, p. 319-329, 1991.

MEJLUMIAN, L. et al. Comparative and functional studies of drosophila species invasión by the gipsy endogenous retrovirus. **Genetics**, v.160, p.201-209, 2002.

MILLER, K. C. et al. Identification of multiple *gypsy* LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. **J. Mol. Evol.**, v.33, p.358-366, 1999.

NACRUR, J. P. Genitelia masculina de *Drosophila* do grupo *mesophragmatica* (DIPTERA). **Revista Brasileira de Biologia**, v.18, p. 243-249, setembro, 1958.

PÉLISSON, A. et. al. About the origin of retrovirus and the co-evolution of the gypsy retrovirus and the co-evolution of the gypsy retrovirus in *Drosophila flamenco* host gene. **Genetica**, v.100, p. 29-37, 1997.

PERIQUET, G. et al. The evolutionary genetics of the hobo transposable element in the *Drosophila melanogaster* complex. **Genetica**, v. 93, p. 79-90, 1994.

PINSKER, W. et al. The evolutionary life history of P transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. **Chromossoma**, V.110, p. 148-158. 1999.

PRUD'HOMME, N. et al. *Flamenco*, a gene controlling the gypsyretrovirus of *D. melanogaster*. **Genetics**, v.139, p.697-711, 1995.

ROBE, L. J. et al. Molecular Phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on the Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Mol. Phylogenet. Evol.** *In press*, 2005.

ROBERTSON and MACLEOD. Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. **Insect Mol. Biol.**, 2 (3): 125-39, 1993.

RUSSEL, C. A. M.; TANEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of Drosophilid species. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p. 391-404, 1995.

SILVA, J. C.; KIDWELL, M. G. Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, p.1050-1060, 2000.

SIMMEN et al. Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. **Science**. v.283, p. 1164-1167, 1999.

STACEY, S. N. et al. Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v.3, p.522-534, 1986.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol**, v.5, p.233-241, 1996.

TERZIAN, C. et al. Evolution of the gypsy endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, p.908-914, 2000.

TEYSSET, L. et al. A Moloney murine leukemia virus-based retroviral vector pseudotyped by the insect retroviral gypsy envelope can infect *Drosophila* cells. **J. Virol.**, v.72, p.853–856, 1998.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p.4673-4680, 1994.

THROCKMORTON, L. H. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*, v.3, p. 421-469, *In*: King Robert C. Ed. **Handbook of genetics**. N. York: Plenum Press. , 1975.

TORTI, C. et al. *Cchobo*, a *hobo*-related sequence in *Ceratitis capitata*. **Genetica**.2005

TUBÍO, J. M.; NAVEIRA, H.; COSTAS, J. Structural and Evolutionary analyses of the TY3/ gypsy group of LTR transposons in the genome of *Anopheles gambiae*. **Mol. Biol. Evol.**2004.

VÁZQUEZ-MANRIQUE, R. P. et al. Evolution of gypsy endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group. **Mol. Biol. Evol.**, v. 17, p. 1185-1193, 2000.

VIEIRA, C. et al. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16(9), p. 1251-1255, 1999.

VIEIRA, C. et al. Evolution of genome size in *Drosophila*. Is the invader's genome being invaded by transposable elements? **Mol. Biol. Evol.**, v.19(7), p. 1154-1161, 2002.

VIEIRA, C.; BIÉMONT, C. Transposable element dynamics in two sibling species: *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**, v.120, p. 115-123, 2004.

WHEELER, M. R. The Drosophilidae: A taxonomic overview. **Univ. Texas Publ.** The university of Texas at Austin. v.1, p.1-9, 1982.

XIONG, Y., and T. H. EICKBUSH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. **EMBO J.**, v.9, p.3353–3362,1990.

YODER, J. A. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **TIG**,v.13 (8), p.335-340, 1997.