

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

**VARIABILIDADE DA ATIVIDADE DO ELEMENTO
DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Drosophila simulans***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sinara Santos Jardim

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**VARIABILIDADE DA ATIVIDADE DO ELEMENTO DE
TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
*Drosophila simulans***

Sinara Santos Jardim

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal, Área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas
Área Biodiversidade Animal

Orientador: Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto

Santa Maria, RS, Brasil

2012

J37v Jardim, Sinara Santos
Variabilidade da atividade do elemento de transposição *mariner* em populações naturais de *Drosophila simulans* / Sinara Santos Jardim. – 2012.
50 f. ; 30 cm

Orientador: Élgion Lúcio da Silva Loreto
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Animal, RS, 2012

1. Biodiversidade animal 2. Drosofilídeos 3. Isolinhagens 4. Regulação de *mariner* I. Loreto, Élgion Lúcio da Silva II. Título.

CDU 595.77

Ficha catalográfica elaborada por
Alenir Inácio Goularte – CRB 10/990
Biblioteca Central da UFSM

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

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

**VARIABILIDADE DA ATIVIDADE DO ELEMENTO DE
TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
*Drosophila simulans***

elaborada por
Sinara Santos Jardim

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Élgion Lúcio da Silva Loreto, Dr
(Presidente/Orientador)

Maríndia Deprá, Dr^a (UFRGS)

Monica Laner Blauth, Dr^a (UFPEL)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

RESUMO

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

VARIABILIDADE DA ATIVIDADE DO ELEMENTO DE TRANSPOSIÇÃO *mariner* EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Drosophila simulans*

AUTORA: Sinara Santos Jardim

ORIENTADOR: Élgion Lúcio da Silva Loreto

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

Os elementos de transposição (TEs) são seqüências de DNA com a capacidade de moverem-se de uma região cromossômica para outra. Estes elementos apresentam mecanismos de transposição diferenciados e diversidade em suas seqüências conferindo-lhes ampla distribuição entre a maioria dos organismos. O transposon de DNA *mariner* é encontrado numa gama de organismos, sendo ubíquo nos eucariotos e é excelente para estudar o comportamento dos TE dentro de populações naturais de *Drosophila*. Entre as populações naturais de *D. simulans* há variações no número de cópias de *mariner* e, conseqüentemente, na sua atividade. Porém, dentro de uma mesma população tais variações são pouco avaliadas. Para estimar a atividade em populações naturais de *D. simulans*, cruzamentos foram realizados entre estas e a linhagem mutante, *D. simulans white-peach*. Os machos da F1 apresentam nos olhos manchas de reversão à condição selvagem num contexto *white-peach*, que são utilizadas para estimar a atividade. Nesse trabalho, foram estabelecidas isolinhagens de populações naturais, recentemente coletadas e utilizadas linhagens mantidas no laboratório. As variáveis avaliaram a atividade dentro e entre as isolinhagens. O número de manchas da F1 revelou quantos eventos de transposição ocorreram e através da análise não apresentou diferenças nas variâncias entre as isolinhagens de um mesmo local de coleta. A área das manchas representa em qual fase do desenvolvimento mais ocorreu transposição. No experimento teste, a fase de embrião foi a que apresentou manchas grandes. Manchas grandes indicam que a mobilização ocorreu nos estágios iniciais de determinação celular. Nos cruzamentos entre as isolinhagens avaliadas e a linhagem *white-peach*, a mobilização ocorreu em todas as fases do desenvolvimento. A análise molecular do número de cópias de *mariner* por qPCR mostrou variação no número de cópias, porém não houve correspondência entre a alta quantidade de cópias e de manchas na maioria das isolinhagens. Essas diferenças podem ser devidas a um único elemento altamente ativo ou de vários com baixa atividade. Mecanismos de regulação de *mariner* já descritos podem estar atuando nas isolinhagens avaliadas, inibindo ou diminuindo a atividade de algumas cópias. Também são necessárias análises adicionais que investiguem quantas cópias realmente estão ativas no genoma das linhagens naturais e recentemente coletadas.

Palavras chave: Drosofilídeos. Isolinhagens. Atividade de *mariner*. Regulação.

ABSTRACT

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

VARIABILITY OF THE ACTIVITY OF THE *mariner* TRANSPOSABLE ELEMENT IN NATURAL POPULATIONS OF *Drosophila simulans*

AUTORA: Sinara Santos Jardim

ORIENTADOR: Élgion Lúcio da Silva Loreto

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2012.

Transposition elements (TEs) are DNA sequences with the ability to move from one chromosome region to another. These elements have different mechanisms of transposition and diversity in their sequences, giving them wide distribution among most organisms. The DNA transposon *mariner* is found in a range of bodies, being ubiquitous in eukaryotes and is excellent for studying the behavior of TE within natural populations of *Drosophila*. Among the natural populations of *D. simulans* there are variations in the number of copies of *mariner* and, hence, in its activity. But within a same population such variations are scarcely assessed. To estimate the activity in natural populations of *D. simulans*, crosses were made between these and the mutant strain, *D. simulans white-peach*. The F1 males have spots in the eyes that indicate reversion to the wild condition in a *white-peach* context, which are used to estimate the activity. In this work, isofemale strains were prepared from recently collected natural populations and from strains maintained in the laboratory. The variables assessed the activity within and between isofemale strains. The number of spots in F1 revealed how many transposition events occurred, and there was no difference in variances between the isofemale strains of the same collection site. The area of the spots showed in what phase of development transposition occurred more frequently. In the test experiment, the embryo stage showed the large patches. Blotches indicated that mobilization occurred in the early stages of cellular determination. In crosses between the evaluated isofemale strains and the *white-peach* strains, mobilization occurred at all stages of development. Molecular analysis of the copies by qPCR showed variation. But there was no correspondence between the high number of copies and patches most isofemale strains. These differences may be due to a single highly active element or of many elements with low activity. Some already described *mariner* regulation mechanisms may be acting in isofemale strains evaluated by inhibiting or decreasing the activity of some copies. Additional analyses are also needed to investigate how many copies are actually active in the genome of natural and recently collected strains.

Keywords: Drosophilidae. Isofemale strains. *marine* activity. Regulation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
1.1 Os elementos transponíveis	06
1.2 Classificação dos elementos transponíveis	07
1.2.1 O elemento <i>mariner</i>	08
1.3 <i>Drosophila simulans</i> como modelo para estudar a atividade de <i>mariner</i>	10
1.3.1 <i>Drosophila simulans</i> e <i>mariner</i>	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1 Objetivos.....	14
2.1.1 Objetivo Geral	14
2.1.2 Objetivos Específicos	14
2.2 Materiais e Métodos	15
2.2.1 Isolinhagens de populações naturais.....	15
2.2.2 Cruzamentos experimentais/ testes fenotípicos.....	17
2.2.2.1 Análise da expressão de <i>mariner</i>	17
2.2.2.2 Estágios do desenvolvimento e atividade do elemento <i>mariner</i>	18
2.2.3 Análises do padrão de mosaicismos dos indivíduos da F1 de cada cruzamento	19
2.2.4 Preparação do DNA	20
2.2.5 PCR Quantitativo em Tempo Real – qPCR.....	20
2.3 Resultados	21
2.3.1 Atividade de <i>mariner</i> nas fases do desenvolvimento	21
2.3.2 Análise da variabilidade da atividade de <i>mariner</i> nas populações.....	22
2.3.2.1 Proporção de Machos Mosaicos	22
2.3.2.2 Variação no número de manchas de pigmentação no olho	24
2.3.2.3 Variação da área das manchas	28
2.3.2.4 Quantificação relativa do número de cópias de <i>mariner</i> por qPCR.....	31
2.4 Discussão	32
2.4.1 Parâmetros usados para avaliar a atividade de <i>mariner</i>	32
2.4.2 Avaliação da atividade de <i>mariner</i> durante o desenvolvimento.....	33
2.4.3 Número e área das manchas	34
2.4.4 Número de cópias e regulação de <i>mariner</i>	35
2.5 Conclusão	36
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os elementos transponíveis

A maioria dos organismos possui, inseridas nos seus genomas, sequências de DNAs chamadas de elementos de transposição (TEs). Os TEs possuem a capacidade de moverem-se de uma região cromossômica para outra. Estes elementos apresentam mecanismos de transposição diferenciados e diversidade em suas sequências conferindo-lhes ampla distribuição entre a maioria dos organismos. A organização estrutural e os mecanismos de transposição permitem conferem aos TEs uma ampla distribuição entre a maioria dos organismos já estudados, com apenas algumas exceções (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007; PRITHAM, 2009). Além disso, podem ocupar grande parte dos genomas como em *Drosophila melanogaster* onde constituem cerca de 15 a 22% do genoma, *Homo sapiens* 45% e em alguns anfíbios e plantas mais de 70% (BIÉMONT e VIEIRA, 2006).

Os TEs são considerados sequências de DNA “parasitas”. Sua transposição e proliferação não controladas pelo hospedeiro podem provocar inativação de genes quando inseridos dentro destes ou promover alterações de expressão gênica, quando inseridos em regiões promotoras. Podem também reduzir a capacidade de sobrevivência e reprodução do hospedeiro ao causarem rearranjos cromossômicos e outras mutações (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007; GIRAUD e CAPY, 1996; KIDWELL e LISCH, 1997).

Contudo, a mobilização dos TEs é uma fonte de variabilidade genética, pois agem como modeladores da estrutura, função e evolução dos genomas hospedeiros (Biémont, 2010). A mobilidade também causa uma grande variação no número de cópias dos TEs dentro dos genomas (KIDWELL e LISCH, 1997). Ocasionalmente, algumas dessas cópias podem ser incorporadas pelo genoma hospedeiro através do processo chamado domesticação gênica, onde os TEs passam a exercer funções no genoma (CORDAUX *et al.*, 2006; NOWACKI *et al.*, 2009).

1.2 Classificação dos elementos transponíveis

A diversidade dos elementos transponíveis descobertos nos genomas fez com que um sistema de classificação fosse necessário. Finnegan (1989) dividiu os TEs em duas classes, sendo que o critério utilizado foi basicamente o mecanismo de transposição. Os elementos da Classe I, ou retrotransposons, possuem o mecanismo de transposição comumente chamado de “copia e cola”. Nesse mecanismo um intermediário de RNA é transcrito a partir de uma cópia dos TEs pré-existent no genoma hospedeiro. Após, esse RNA é usado como molde para síntese de DNA pela enzima transcriptase reversa e esta cópia de DNA é inserida em outra região genômica pela enzima integrase. Estas enzimas podem ser codificadas pelo próprio elemento e transcritas pelo hospedeiro e cada ciclo pode gerar novas cópia do retrotransposon.

Os retrotransposons são subdivididos dentro de cinco ordens baseados na sua organização, características do mecanismo de inserção e filogenia da transcriptase reversa: retrotransposons com LTRs, elementos *DIRS-like*, elementos *Penelope-like*, LINEs e SINEs. Cada ordem contém grupos de elementos autônomos, com exceção dos SINES que constituem elementos não-autônomos. Os elementos autônomos codificam todos os domínios que são normalmente necessários para a sua transposição. Os SINES não são derivados de TEs, mas podem abrigar um domínio interno com capacidade de codificação para genes de transposição e podem se tornar móveis por ativação cruzada de um elemento autônomo. (WICKER *et al.*, 2007).

Já os elementos da Classe II são chamados de transposons e o mecanismo de transposição é conhecido como “corta e cola” (WICKER *et al.*, 2007). Nesta classe o intermediário de DNA pode ser retirado do seu sítio original e inserido em outra região do genoma pela enzima transposase, que pode ser codificada pelo próprio elemento.

Outro sistema de classificação já foi proposto para os TEs (CAPY *et al.*, 1998). Segundo Wicker *et al.* (2007), os TEs são classificados em um sistema mais atual que manteve as duas classes já descritas, porém novas classificações mais inclusivas foram adicionadas e seguem uma ordem hierárquica taxonômica:

- Subclasse: Aqueles TEs que durante a mobilização cortam os dois filamentos de DNA, deixando um sítio doador no local para inserirem-se em outra região pertencem a subclasse I, enquanto aqueles que apenas cortam um filamento de DNA, gerando cópias de si mesmo pertencem a Subclasse II.

- Ordem: distingue entre os mecanismos de inserção, organização geral e enzimologia dos TEs.

- Superfamília: além de compartilhar a mesma estratégia de transposição dentro de uma ordem, são distinguidas por apresentarem características uniformes como estrutura de proteínas, domínios não codificantes, presença e tamanho de repetições de nucleotídeos geradas nas extremidades dos TEs quando são inseridos em outros locais dos genomas. Este sítio é chamado de sítio alvo de duplicação (TSD do inglês – *Target Site Duplication*).

- Família: é baseada na conservação de aminoácidos. A similaridade entre TEs que pertencem à mesma família em suas sequências codificadoras, domínios internos ou em regiões repetidas terminais deve ser de 80% ou mais.

- Subfamília: são definidas através de análises filogenéticas podendo distinguir em alguns casos entre populações muito homogêneas de elementos autônomos e não autônomos.

1.2.1 O elemento *mariner*

O elemento de transposição *mariner* pertence à Classe II, Subclasse I, Ordem TIR, Superfamília TC1-*mariner* e Família *mariner*. A superfamília TC1-*mariner* contém os elementos *mariner*, TC1, *pogo* e seus homólogos. Caracterizam-se por possuírem de 1300 a 2400 pares de bases de comprimento, uma única região codificadora da enzima transposase ou também chamada de quadro aberto de leitura (ORF, do inglês *Opening Reading Frame*). Também possuem regiões repetidas terminais invertidas (TIR do inglês: *Terminal Inverted Repeats*), que flaqueiam a ORF (KAZAZIAN, 2004). A transposase apresenta uma assinatura de três aminoácidos, sendo dois resíduos de ácido aspártico DD, separados por 34 a 35 aminoácidos de um resíduo de ácido aspártico ou glutâmico, D/E.

Os TEs da superfamília TC1-*mariner* podem ser considerados os transposons de DNA mais amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em fungos, plantas ciliados, nematóides, artrópodes, peixes, rãs e até em seres humanos (PLASTERK *et al.*, 1999). Geralmente a superfamília TC1-*mariner* não requer fatores do hospedeiro para sua mobilidade, pois sua transposase é suficiente para promover todos os passos da mobilização. Esta característica explica a ampla distribuição e os tornam ferramentas na criação de células geneticamente modificadas, pois suas transposases podem catalisar a integração de DNA exógeno nos genomas (AUGÉ-GOUILLOU *et al.*, 2005; SASAKURA *et al.*, 2010).

Dentro da superfamília TC1-*mariner* a família *mariner* é a mais conhecida e sua ampla distribuição entre os genomas eucarióticos pode ser explicada em parte pela habilidade que seus elementos têm de se transporem entre os genomas (LAMPE *et al.*, 2003). Essa habilidade é conhecida como transferência horizontal, a qual promove o movimento de informação genética entre organismos com relação de parentesco distante ou pouco distantes (KEELING e PALMER, 2008; LOHE *et al.*, 1995; MARUYAMA e HARTL, 1991).

A família *mariner* é subdividida em nove subfamílias: *mauritiana*, *cecropia*, *croplia*, *rosa*, *melifera*, *lineata*, *capitata*, *irritans*, *briggsae*, *elegans* e mais três novas *Atlantis*, *CRI* e talvez *urt* (ROUAULT *et al.*, 2009), sendo que várias sequências de elementos *mariner* encontradas em Drosophilidae pertencem à subfamília *mauritiana*. Tais elementos *mariner* são intimamente relacionados ao elemento ativo MOS1 inicialmente descrito em *D. mauritiana* e são amplamente distribuídos na família Drosophilidae (BRUNET *et al.*, 1994; BRUNET *et al.*, 1999; MARUYAMA e HARTL, 1991).

Recentemente Wallau *et al.* (2011) investigaram a história evolutiva de 49 espécies principalmente de Drosophilidae neotropicais e encontraram em 23 espécies elementos relacionados a *mariner* (MLEs) de três subfamílias diferentes: 18 espécies tinham MLEs da subfamília *melifera*, 15 da subfamília *mauritiana* e três da subfamília *irritans*. Algumas espécies apresentaram elementos de mais de uma subfamília em seu genoma.

O elemento *mariner* foi descoberto por causar uma mutação de cor de olho em *Drosophila mauritiana*. Quando a mutação foi investigada, encontrou-se o elemento inserido na região promotora do gene *white*, localizado no cromossomo X, gerando uma cor do olho pêssego chamada de mutação *white-peach* (JACOBSON e HARTL, 1985; JACOBSON *et al.*, 1986). Depois que o elemento *mariner* foi caracterizado, este alelo mutante também chamado *white-peach*, foi inserido em linhagens de *D. simulans* e *D. melanogaster* (BRYAN *et al.*, 1990; GARZA *et al.*, 1991). O alelo mutante não possui capacidade de produzir a transposase e promover a mobilização permanecendo estável, sem evidências de uma excisão em células somáticas ou germinativas, pois somente a cópia inativa está presente no genoma (HARTL, 2001). Na presença de um elemento *mariner* potencialmente autônomo, ou seja, capaz de produzir uma transposase funcional, o elemento *mariner* não autônomo pode utilizar essa transposase *in trans* e ser removido do gene *white*, causando reversão parcial da mutação à condição selvagem. Quando isto ocorre em células somáticas, um padrão mosaico de pigmentação nos olhos é esperado, ou seja, manchas de pigmentação vermelha num contexto *white-peach* (LOHE e HARTL, 1996). Esta linhagem pode ser utilizada em cruzamentos com linhagens selvagens promovendo testes fenotípicos

em que a atividade do elemento *mariner* pode ser avaliada (CAPY *et al.*, 1990). A taxa de excisão somática do elemento não autônomo presente na linhagem *white-peach* é dependente do número de cópias de *mariner* autônomo ativo presentes no genoma da linhagem selvagem usada nos cruzamentos e pode ser quantificada (MEDHORA *et al.*, 1988; MEDHORA *et al.*, 1991).

O mosaicismo tem sido utilizado para quantificação do nível de atividade do elemento *mariner* relacionada à latitude e distribuição geográfica em populações naturais de *D. simulans* (GIRAUD e CAPY, 1996; RUSSELL e WOODRUFF, 1999; PICOT *et al.*, 2008). Apesar de todos os estudos sobre os elementos transponíveis, a sua dinâmica dentro e entre as populações dos organismos que os contém é pouco compreendida. Alguns trabalhos tentam compreender quais fatores podem influenciar a atividade e o número de cópias como, por exemplo, estresse ambiental e cruzamentos específicos durante a colonização das espécies portadoras dos elementos (BIÉMONT *et al.*, 2003; BELYAYEV *et al.*, 2010; CAPY *et al.*, 2000; LOCKTON *et al.*, 2008).

1.3 *Drosophila simulans* como modelo para estudar a atividade de *mariner*

Drosophila simulans pertence à família Drosophilidae que é a mais amplamente distribuída entre mais de 150 famílias que compõem a ordem Diptera (YEATES e WIEGMANN, 2005). Fazem parte dessa família mais de 4.000 espécies divididas em 76 gêneros (BÄCHLI, 2011). Os ancestrais da família Drosophilidae habitavam regiões do Velho Mundo e utilizavam como recurso alimentar fungos crescidos em folheto, sendo que a diversificação de substratos foi resultado de oportunismos derivados (THROCKMORTON, 1975). Dentro da família Drosophilidae, o gênero *Drosophila* contém 1.149 espécies subdivididas em oito subgêneros. Destes, *Sophophora* se destaca pela diversidade e apresenta 332 espécies subdivididas em oito grupos (BÄCHLI, 2011). *Drosophila simulans* faz parte do grupo e subgrupo *melanogaster* juntamente com mais oito espécies: *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. erecta*, *D. orena*, *D. yakuba*, *D. teissieri* e *D. santomea*.

Drosophila simulans atualmente possui distribuição cosmopolita, e suas populações ancestrais se originaram na África central e ilhas do leste como Madagascar, Seychelles e Mascarenhas (LACHAISE *et al.*, 1988). *D. simulans* possui um intrigante cenário quanto à distribuição de TEs no genoma, pois há uma variedade de elementos com

números de cópias muito distintos em populações de locais diferentes (VIEIRA e BIÉMONT, 2004). Além disso, a expansão mundial de *D. simulans*, quando comparada a sua espécie irmã *D. melanogaster*, é considerada recente, como por exemplo, a invasão da Austrália, Américas do Norte e Sul que acompanha a colonização humana (LACHAISE *et al.*, 1988). Assim, esta é uma espécie interessante para acompanhar e entender a dinâmica da invasão dos elementos transponíveis em populações naturais (BIÉMONT *et al.*, 2003).

1.3.1 *Drosophila simulans* e *mariner*

Em *D. simulans* o elemento de transposição *mariner* possui um número de cópias variável (CAPY *et al.*, 1992; MARUYAMA e HARTL, 1991) e pode ser encontrado em diversas populações naturais (GIRAUD e CAPY, 1996; RUSSELL e WOODRUFF, 1999). A distribuição de *mariner* no genoma das populações de *D. simulans* pode estar relacionada aos processos de estruturação populacional, colonização e novas condições ambientais que podem ativar a mobilização do elemento (BIÉMONT *et al.*, 1999; PICOT *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que a mobilização de *mariner* é diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Isto sugere que a atividade do elemento é influenciada por variação na temperatura de manutenção dos drosofilídeos em laboratório (CHAKRANI *et al.*, 1993). Posteriormente, correlações entre a atividade somática de *mariner* e a latitude demonstraram que pode existir uma clina, ou seja, a atividade do elemento aumenta inversamente proporcional à latitude de origem das populações naturais (RUSSELL e WOODRUFF, 1999). Porém uma relação diretamente proporcional também já foi demonstrada, a atividade do elemento aumenta com o aumento da latitude (GIRAUD e CAPY, 1996). Estas correlações entre latitude e atividade do elemento, em um primeiro momento, não puderam ser generalizadas. PICOT *et al.* (2008) sugeriram que todas as invasões recentes de *D. simulans* mostram alta atividade de *mariner* portanto a distribuição do elemento está provavelmente associada com a história evolutiva de *D. simulans*. Assim, em regiões de recente invasão ainda não há um controle efetivo do hospedeiro contra a transposição.

Nos trabalhos de correlação e história evolutiva de *mariner* apresentados acima juntamente com outros estudos (CAPY *et al.*, 1990; GIRAUD e CAPY, 1996; RUSSELL e WOODRUFF, 1999) a atividade do elemento foi quantificada através de testes fenotípicos nos quais cruzamentos experimentais entre a linhagem *D. simulans white-peach* e linhagens

de populações naturais são realizados. A F1 é analisada quando a presença ou ausência de mosaicismos nos olhos e a taxa de excisão somática do elemento é estabelecida através da proporção de machos mosaicos (PMM) (RUSSELL e WOODRUFF, 1999). No entanto a medida da atividade transposicional feita a partir da PMM, embora fácil de fazer e proporcione uma estimativa razoável da atividade dos elementos *mariner* presentes nos genomas de uma população, apresenta algumas limitações. Diferentes populações, com PMMs similares, podem apresentar variações no padrão de mosaicismos observado. Alguns olhos mosaicos podem apresentar apenas um ou poucos ocelos com reversão da mutação, ao passo que outros podem apresentar padrões de grandes áreas ou muitas regiões de reversão da mutação. Essas variações são, possivelmente, decorrentes de diferentes *backgrounds* genéticos para produção de transposase de *mariner* ou do controle do mecanismo de transposição. Na tentativa de captar estas diferenças, padrões de classificação visual baseado no número e tamanho das manchas têm sido propostos (Figura 1).

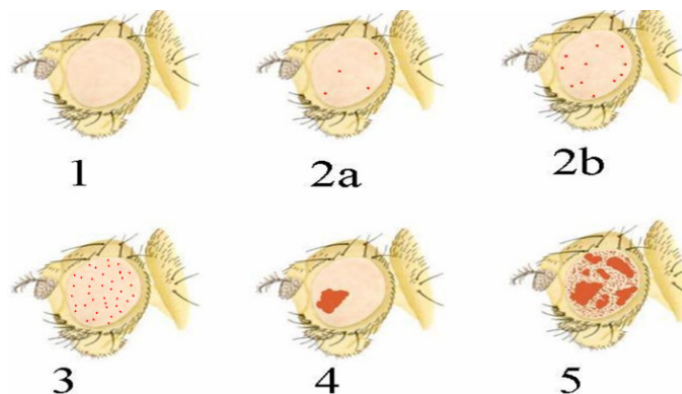


Figura 1 – Tabela de classificação dos machos mosaicos. 1: progênie de *white-peach* sem mosaico; 2a e 2b: poucas manchas- indicando baixa atividade de *mariner*; 3: muitas manchas pequenas indica atividade moderada de *mariner* ; 4: poucas manchas grandes, indica maior atividade de *mariner*; 5: muitas manchas grandes, indica alta atividade de *mariner* (JARDIM e LORETO, 2011).

Esta classificação visual é bastante imprecisa, pois leva em conta somente o olho mais pigmentado ignorando as manchas do outro olho, além do que, estes padrões formam um contínuo, e a classificação nas diferentes classes passa por uma decisão arbitrária do avaliador (CAPY *et al.*, 1990). Outro fator que não é levado em conta é o período de desenvolvimento que seria importante, uma vez que dependendo do estágio de desenvolvimento em que a

excisão ocorre, pode haver variação no tamanho da mancha resultante. Provavelmente um único evento de transposição pode dar origem a uma grande área pigmentada e isto é classificado como uma alta taxa de transposição, superestimando a atividade. Portanto, esta metodologia tradicional que utiliza somente a área das manchas como uma medida da atividade de *mariner* é ineficiente em quantificar os eventos de transposição. Em vista disso, fizemos um estudo para estabelecer uma metodologia mais adequada para a quantificação da atividade do transposon *mariner*. Esta metodologia foi descrita e aceita na Revista *Drosophila Information Service – DIS* (Apêndice A).

Outro fator que interfere nas análises é que a maioria dos trabalhos não leva em consideração as variações intrapopulacionais da atividade de *mariner* já que a história evolutiva do elemento acompanha invasão recente de *D. simulans*.

Um trabalho realizado em nosso laboratório encontrou variação intrapopulacional da atividade do elemento em populações de *D. simulans* (STEINER, 2009). Neste trabalho os pontos de coletas distanciavam-se por 4 km e eram diferentes quanto suas características ambientais. Estas diferenças podem influenciar não só a composição da comunidade faunística encontrada em cada um dos pontos, como sua abundância, provocando maior ou menor interação entre e dentro das espécies, interferindo na variabilidade genética das populações coletadas. Assim, para dar continuidade aos estudos da variação da atividade do elemento dentro e entre as populações naturais propomos esse trabalho com os objetivos apresentados a seguir.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o entendimento da relação entre o número de cópias e o nível de atividade transcricional do elemento *mariner* entre as populações naturais de *D. simulans*.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Estudar a atividade do elemento *mariner* nas diferentes fases do desenvolvimento de *D. simulans*.

- Relacionar o número de cópias e atividade do elemento *mariner* de isolinhagens feitas a partir de populações naturais mantidas em laboratório de *D. simulans* coletadas ao longo da América do Sul, na Ilha Havaiana e em duas regiões do Sul do país.

- Quantificar o número de cópias, e atividade do elemento *mariner* das isolinhagens, através da técnica do PCR quantitativo em tempo real.

- Analisar o número de manchas e área das manchas.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Isolinhagens de populações naturais

Isolinhagens foram usadas para avaliar a atividade do elemento *mariner* dentro e entre populações naturais de *D. simulans*. As isolinhagens foram estabelecidas a partir de fêmeas fertilizadas provenientes de um *pool* de populações naturais mantidas no laboratório. Também foram estabelecidas isolinhagens a partir de coletas em duas localidades. Os locais, datas das coletas e data das isolinhagens estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Locais e datas das coletas das populações naturais de *Drosophila simulans* mantidas no laboratório. Legenda e data das isolinhagens feitas a partir das populações naturais. ¹ - Isolinhagens estabelecidas a partir de um *pool* de populações mantidas em laboratório; ² - Isolinhagens estabelecidas diretamente de coletas.

Localização	Ano da coleta	Isolinhas	Coordenadas
Argentina, Tandil	2008	TAN01-TAN02 ¹	Latitude: 37°19' S; Longitude: 59° 9' O
Brasil, Campeche, Florianópolis – SC	1997	CAM01- CAM02- CAM03 ¹	Latitude: 27°40' S; Longitude: 48°29' O
Brasil, Brasília-DF	2002	BR01 - BRA02 - BRA03 ¹	Latitude: 15°49' S; Longitude; 47°55' O
Estados Unidos da América,Havaí	Desconhecido	HAV01- HAV02 ¹	Latitude: 19°53' N; Longitude: 155°34' O
Brasil, São Marcos, Santa Maria-RS	2010	SM01 - SM02 - SM03 - SM04 - SM05 ²	Latitude: 29°41' S; Longitude: 53°42' O
Brasil, Jardim Botânico UFSM, Santa Maria-RS	2010/2011	JB01 - JB02 - JB03 ²	Latitude: 29°42' S; Longitude: 53°43' O

Legenda: TAN, Tandil; HAV, Havaí; SM, São Marcos; JB, Jardim Botânico; CAM, Campeche; BRA, Brasília.

As isolinhagens de São Marcos e do Jardim Botânico foram estabelecidas através da coleta de fêmeas fertilizadas, com isca de banana. As fêmeas foram colocadas em meios de culturas separadamente e a prole mantida sob condições controladas de alimentação e temperatura. Estes dois locais de coletas foram escolhidos por apresentarem variação da atividade do elemento *mariner* detectada em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (STEINER, 2009) e também para analisar a atividade do elemento em populações recentemente coletadas.

O uso de isolinhagens de fêmeas selvagens é uma ferramenta para o estudo da estrutura genômica de populações naturais de *Drosophila*. Através desse método características quantitativas sob condições de laboratório podem ser analisadas intraclasse, permitindo correlações genéticas (DAVID *et al.*, 2005).

A linhagem de *D. simulans white-peach* (CAPY *et al.*, 1990) foi gentilmente cedida por Dr. Pierre Capy (CNRS – Paris, França) e a linhagem do Havaí pelo Dr. Jean David (CNRS – Paris, França) .

2.2.2 Cruzamentos experimentais/ testes fenotípicos

2.2.2.1 Análise da expressão de *mariner*

Para os ensaios de expressão do elemento *mariner*, cruzamentos consistiram de cinco a dez fêmeas não fertilizadas de *D. simulans* da linhagem *white-peach*, com cinco a dez machos das isolinhagens proveniente do *pool* das populações naturais e dos dois locais de coletas. A análise foi feita a partir da observação do mosaicismismo nos olhos dos machos *white-peach* da progênie. Os cruzamentos foram realizados em uma sala climatizada entre 23° e 25°C e o desenho experimental dos cruzamentos está na Figura 2.

A análise primordial da expressão do elemento *mariner* foi feita pela quantificação da PMM (RUSSELL e WOODRUFF, 1999).

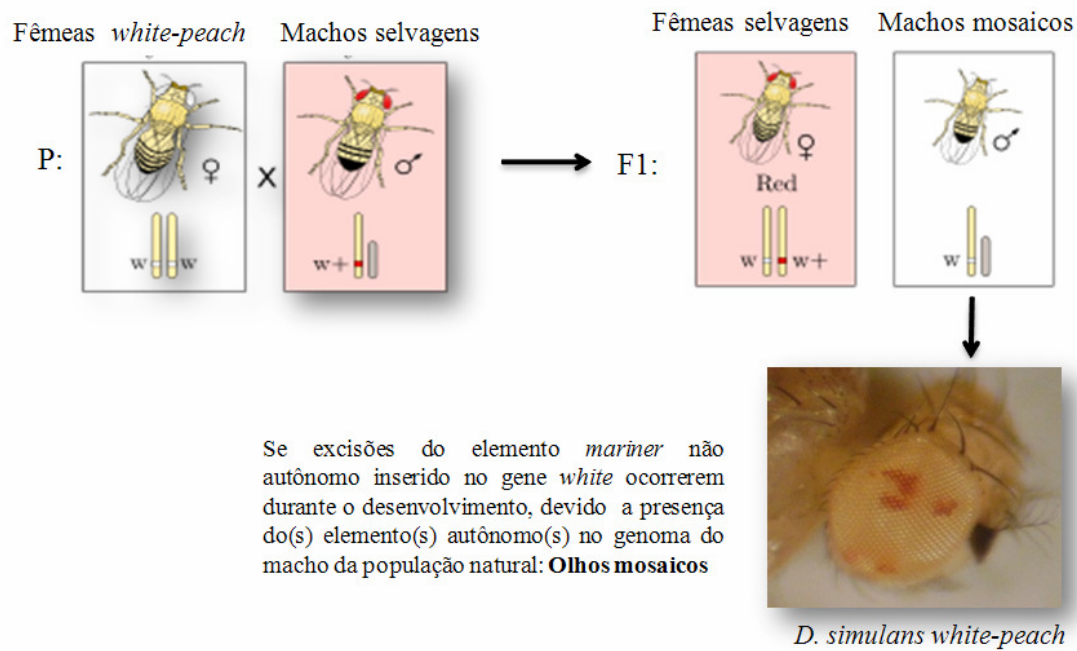


Figura 2 – Modelo dos cruzamentos usados para estimar a taxa de excisão do elemento *mariner* (modificado de Chakrani *et al.*, 1993). Os machos mosaicos da F1 foram classificados de acordo com o número e tamanho das manchas observado nos olhos.

2.2.2.2 Estágios do desenvolvimento e atividade do elemento *mariner*

Para verificar se há variação de atividade do elemento *mariner* durante o desenvolvimento de *D. simulans*, inferida pelo fenótipo de olho, empregamos o ensaio de mudança de temperatura. Foram considerados os estágios de desenvolvimento: embrião, 3º instar larval e pupa. Sabe-se que algumas linhagens de populações naturais quando submetidas a altas temperaturas induzem a mobilização de *mariner* (CHAKRANI *et al.*, 1993). Frascos com meio de cultura contendo entre cinco a dez fêmeas não fertilizadas da linhagem *white-peach* e machos da linhagem selvagem de Brasília, a qual já foi relatada alta atividade do elemento, foram mantidas em temperaturas controladas. A temperatura dos cruzamentos foi mantida a 20°C e somente nos estágios testados foi elevada a 28°C, sendo que dois frascos de controle permaneceram a 20°C e 28 °C durante todo o ciclo. A F1 de cada tratamento foi classificada em: classe 1, com um ou poucos ocelos apresentaram pigmentação; Classe 2, poucos ocelos pigmentados e manchas pequenas; Classe 3 grandes manchas.

2.2.3 Análises do padrão de mosaicismos dos indivíduos da F1 de cada cruzamento

Para uma análise mais detalhada da atividade do transposon *mariner* nas diferentes populações e isolinhagens, empregamos também as metodologias descritas em Jardim e Loreto (2011) (Apêndice A).

Cada macho com manchas foi fotografado com auxílio de uma câmera acoplada em um estereomicroscópio com aumento de 8x. A área de cada mancha foi medida em μm^2 , com auxílio do *software* de edição de imagens AxioVision 4.8.2.0 (Figura 3) e os valores transformados em proporção com relação a área total dos olhos. Também foi contado visualmente o número de manchas das fotografias.

A progênie de machos *with-peach* foi analisada e classificada, com base na Figura 1, quanto à presença de manchas pigmentadas dos olhos. Após a classificação foi calculada a taxa de excisão somática do elemento *mariner* inativo o qual é dada pela razão entre a quantidade de machos mosaicos obtidos e o total de machos da F1. A (PMM) indica a taxa global de atividade de *mariner* para cada linhagem (RUSSELL e WOODRUFF, 1999).

Os dados para número de manchas foram tratados estatisticamente no programa BioEstat 5.0. O teste de variância *Kruskal-Wallis* foi realizado entre todas as isolinhagens para o número de manchas e área considerando p significativo abaixo de 0,05. Os valores de proporção foram previamente transformados ($x' = \text{asen}(\text{raiz } x)$).

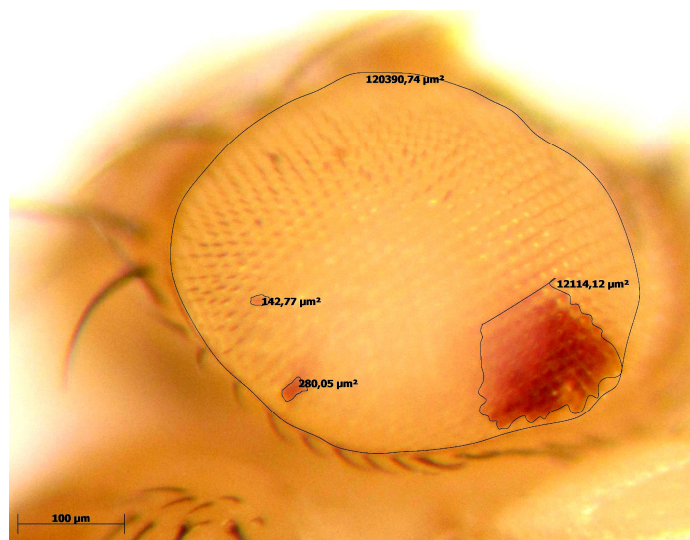


Figura 3 – Olho de um macho mosaico proveniente da F1 do cruzamento da isolinhagem CAM01 e fêmeas *white-peach*. Imagem obtida através de uma câmera digital acoplada em um estereomicroscópio. Para edição, foi usado o *software* AxioVision 4.8.2.0, aumento 8 x.

2.2.4 Preparação do DNA

O DNA das isolinhagens investigadas foi preparado de acordo com o protocolo de Oliveira *et al.* (2009). O DNA genômico foi quantificado quanto a sua concentração no equipamento *NanoDrop 3300 Spectrophotometer*.

2.2.5 PCR Quantitativo em Tempo Real – qPCR

A quantificação por qPCR foi realizada para estabelecer o número relativo de cópias de *mariner* das isolinhagens provenientes das populações naturais. Para detectar a presença do elemento *mariner* no genoma das isolinhagens os seguintes *primers* foram usados: MarRTint 5' TGCTCAAACGCAAAAACAAC 3' e MarRTint_rev 5' ACGATGCAAAAACGACTTCC 3'. Os *primers* foram desenhados na região conservada da ORF do elemento *mariner* de *D. simulans* e os fragmentos amplificados foram de aproximadamente de 180 pares de bases.

As amplificações foram realizadas em um sistema *StepOnePlus* da *Applied Biosystems*, usando SYBR Green como corante fluorescente específico que detecta DNA dupla fita. Para a amplificação do gene de referência foi usado *Gpdh* (glicerol 3 fosfato desidrogenase). O fragmento tem 135 pares de bases e cópia única no genoma. Os *primers* para a amplificação desse gene são GPDH 40 (5'-GAGGTGGCTGAGGGCAACTT-3') e GPDH 155 (5'-AACCTCCACGGCATCAGCAT-3') (DEPRÁ *et al.* 2009).

A quantificação relativa do número de cópias de *mariner* foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) usando os valores de Ct obtidos com o *software StepOne v2.0*.

Os parâmetros do qPCR iniciaram a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (60°C, 15 segundos) extensão (72°C por 20 segundos) seguido da curva de desnaturação (95°C, 15 segundos; 60°C 1 minuto e 95°C, 15 segundos). A medida da fluorescência foi feita em cada ciclo a 72°C.

Para o mix de 10ul de reagentes foram adicionados, 10ul de DNA de cada isolinhagem a uma concentração de 0.5 ng. As concentrações finais dos demais reagentes foram: *primers*

0.2 uM, 25mM de nucleotídeos, tampão PCR 1x, MgCl₂ 3 mM, SYBER Green 0.1x e Taq DNA *Platinum Polimerase* 0.25U.

O número de cópias de *mariner* foi obtido através da expressão $2^{-\Delta Ct}$, onde o ΔCt é a diferença entre os valores do ciclo *threshold* (Ct) do alvo e os valores Ct das amostras do gene de referência. Para o controle foi utilizada a linhagem *D. melanogaster white-peach* a qual possui cópia única de *mariner* não autônoma inserida no cromossomo X.

2.3 Resultados

2.3.1 Atividade de *mariner* nas fases do desenvolvimento

Para os ensaios de mudança de temperatura, cruzamentos foram realizados entre as linhagens de *D. simulans* de Brasília e a linhagem de *D. simulans white-peach*, os descendentes machos de cada temperatura foram quantificados, com base na figura 1, quanto a PMM e proporção de machos em cada classe (Figura 4). Para a temperatura de controle, 20°C a PMM foi de 26% sendo que destes, 24% pertencem à classe 1 (1 a 2 omatídeos pigmentados), 2% à classe 2 (poucos omatídeos pigmentados e pequenos), nenhum macho à classe 3 (manchas grandes) e 78% não apresentaram manchas. Quando os embriões foram submetidos à temperatura de 28°C, a PMM foi de 11% sendo que 11% dos machos mosaicos pertencem a classe 1, 5% à classe 2 e 17% à classe 3 e 67% sem manchas. No tratamento do 3º Instar larval a PMM calculada foi de 34%, onde 20% pertencem à classe 1, 12% à classe 2, somente 4% à classe 3 e 64% sem manchas. No tratamento das pupas a 28°C a PMM encontrada foi de 25% onde 11% pertencem à classe 1, 7% à classe 2 e 7% à classe 3 e 75% sem manchas. Finalmente, no tratamento controle em que todo o desenvolvimento dos drosofilídeos foi mantido a 28°C a PMM calculada foi de 62% dos quais, 20% pertencem à classe 1, 22% à classe 2 e 20% à classe 3 e somente 38% sem manchas.

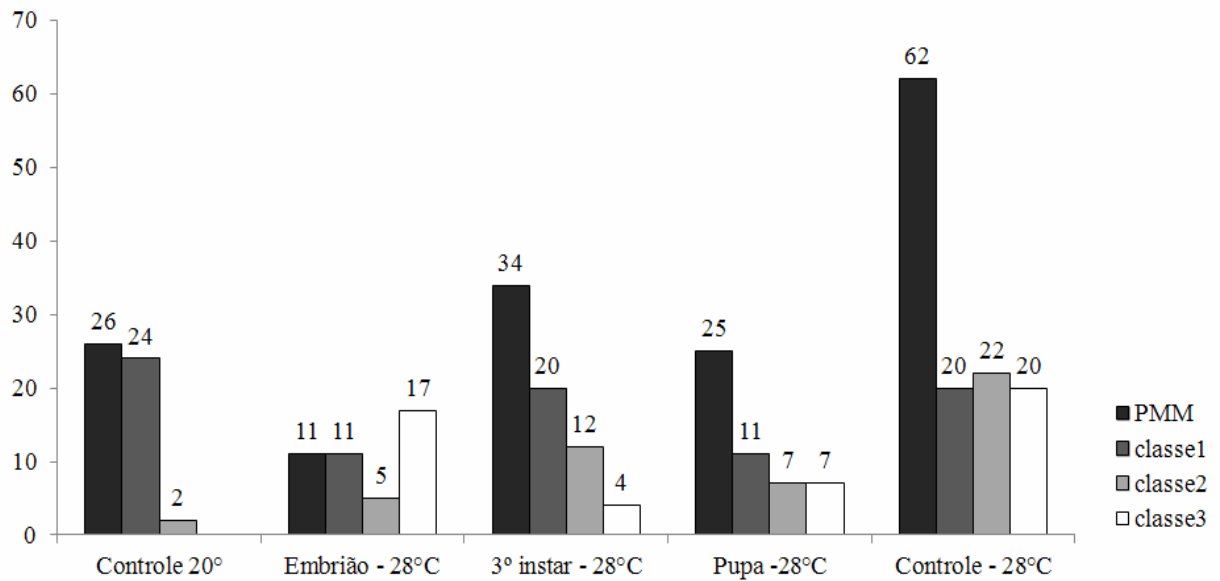


Figura 4 – PMM nos testes fenotípicos de troca de temperatura. Controles, todo o desenvolvimento mantido a 20°C e 28°C e nos demais tratamentos foi elevada a 28°C na fase de Embrião, 3º Instar Larval, Pupa. As classes consideradas foram Classe 1: 1 a 2 omatídeos pigmentados; Classe 2: poucos omatídeos e pequenos; Classe 3: manchas grandes.

2.3.2 Análise da variabilidade da atividade de *mariner* nas populações

2.3.2.1 Proporção de Machos Mosaicos

Dos 18 cruzamentos realizados, obtiveram-se 813 machos sendo que 200 apresentaram manchas e 613 não apresentaram. A partir desses machos da F1, a taxa de excisão somática de *mariner* foi calculada para cada isolinhagem, através da PMM e os resultados estão apresentados na Figura 5. Todas as isolinhagens apresentaram atividade de *mariner* com exceção da isolinhagem SM04 onde nasceram 35 machos sem manchas. A isolinhagem TAN01 apresentou valor extremo de 81,8% dos machos com mosaicismo e a isolinhagem CAM03 apresentou a menor proporção de machos mosaicos, 4,4%. Podemos notar que há uma grande variação na atividade de *mariner* medida pela PMM, tanto entre as populações como também há variação intrapopulacional.

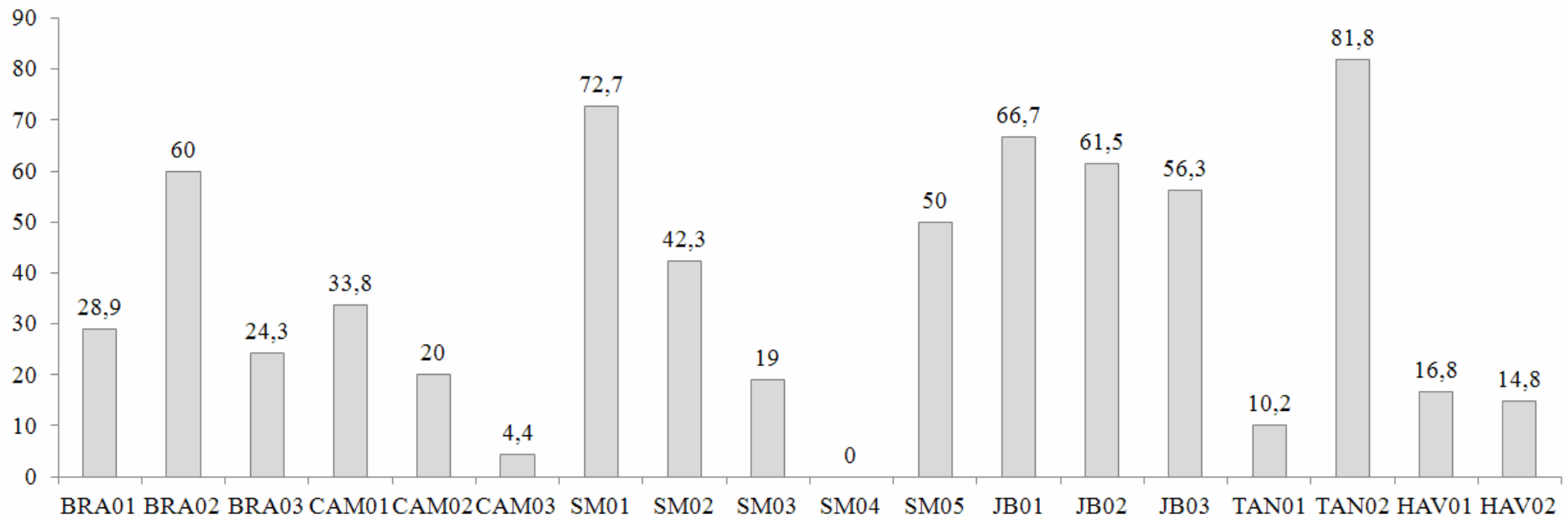


Figura 5 – PMM de cada isolinhagem: TAN, Tandil- Argentina; HAV, Estados Unidos- Havaí; SM, São Marcos- Santa Maria; JB, Jardim Botânico-Santa Maria; CAM, Campeche-SC; BRA, Brasília – DF.

2.3.2.2 Variação no número de manchas de pigmentação no olho

O número de manchas observado nos olhos mosaico dos machos foi contabilizado e sua distribuição é apresentada na Figura 6. As isolinhagens com extremos na variação de manchas foram JB02 com 1 a 76 manchas (Figura 7) e SM03 e HAV1 com 1 a 3 três manchas. As medianas do número de manchas para as isolinhagens brasileiras foram:

A análise da variância (*Kruskal-Wallis*) de todas as isolinhagens revelou que entre algumas há uma heterogeneidade significativa no número de manchas (Tabela 2). A análise da variância também foi feita nas isolinhagens recentemente coletadas para verificar se há diferenças significativas no número de manchas de pigmentação entre e dentro das isolinhagens dos dois locais. Nas isolinhagens de SM houve diferença no número de manchas entre: SM01 e SM02 com $p = 0,017$; SM01 e SM03 com $p = 0,030$. Já entre as isolinhagens dos dois pontos de coletas houve apenas diferença estatística significativa entre: JB01 e SM02 com $p = 0,0001$; JB01 e SM03 com $p = 0,0042$; JB02 e SM02 com $p = 0,0075$; JB02 e SM03 com $p = 0,0184$; JB03 e SM02 com $p = 0,0458$ e coeficiente de correlação $H = 74,18$.

Agrupando-se o número de manchas de cada ponto de coleta a diferença estatística significativa dentro das isolinhagens JB e SM foram de $p = 0,0008$ e coeficiente de correlação $H = 11,45$.

Nas demais isolinhagens somente Tandil apresentou diferenças no número de manchas com as isolinhagens TAN01 e TAN02, com $p = 0,0016$

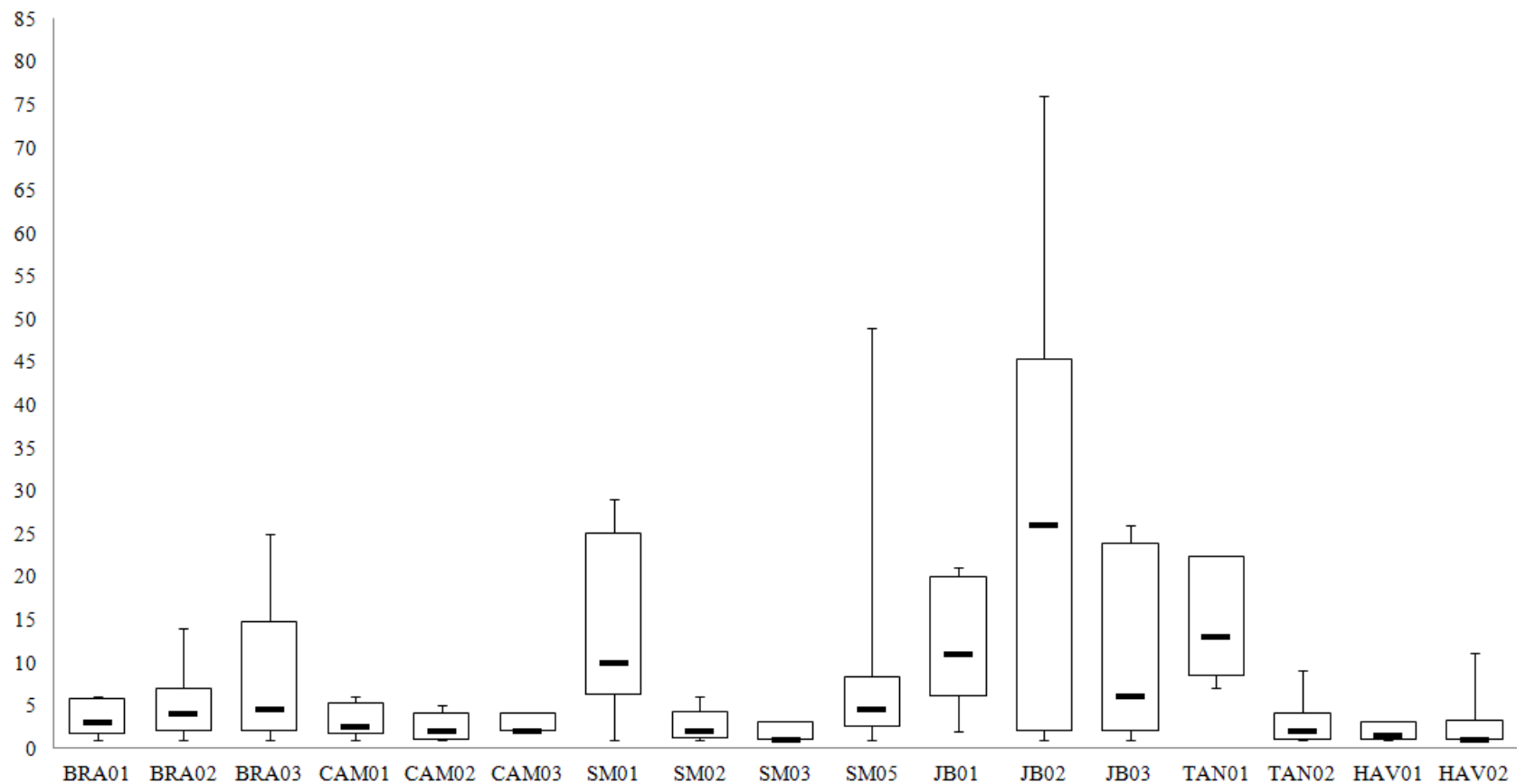


Figura 6- Distribuição do número de manchas em todos os cruzamentos das isolinhagens. Barra preta representa a mediana do número de manchas e as barras de erros o número máximo e o mínimo de manchas representando a variação do número de manchas dos machos mosaicos de cada isolinhagem. TAN, Tandil- Argentina; HAV, Estados Unidos- Havaí; SM, São Marcos - Santa Maria; JB, Jardim Botânico-Santa Maria; CAM, Campeche-SC; BRA, Brasília – DF.

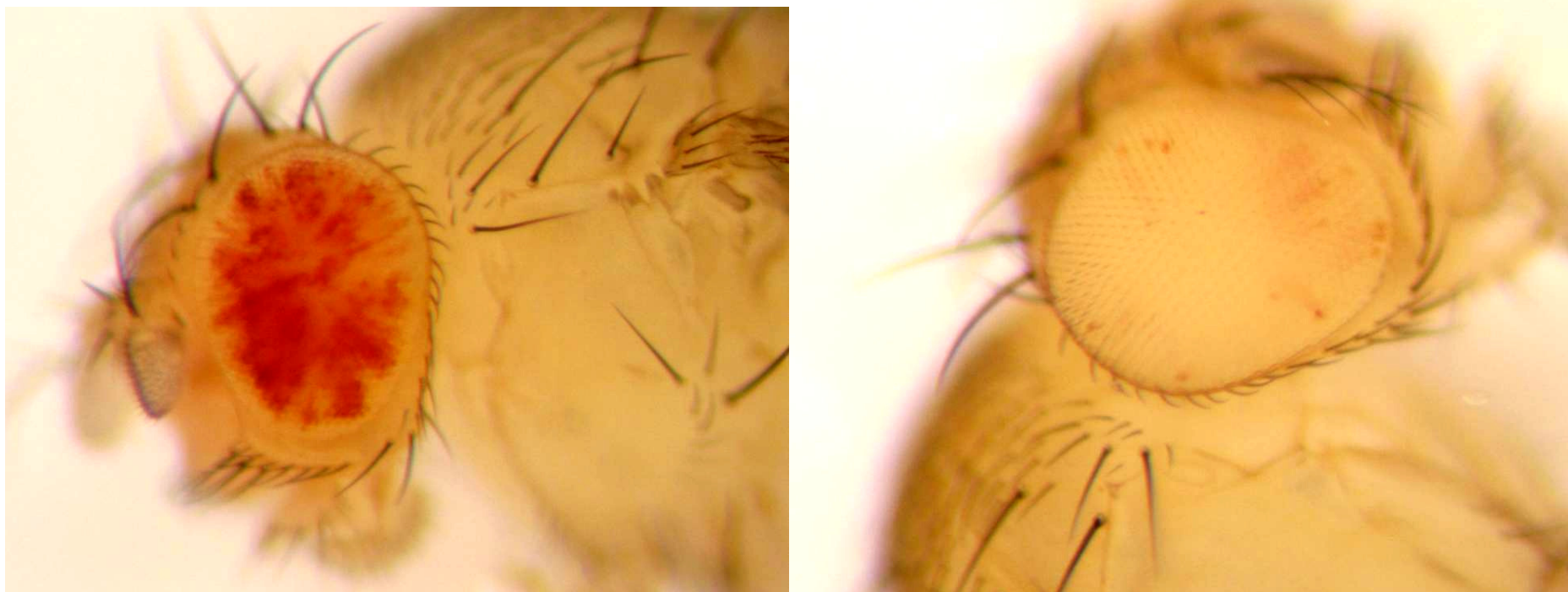


Figura7 – Imagens de dois indivíduos machos da F1 da isolinhagem JB02, mostrando a variação no número e na área das manchas.

Tabela 2 – Valores de p obtidos a partir da análise da variância pelo teste *Kruskal-Wallis*. Os valores acima da diagonal são os valores de p para a área das manchas e os valores abaixo da diagonal são os valores de p para o número de manchas, considerando p significativo $< 0,05$.

	TAN01	SM01	JB01	JB02	BRA02	JB03	SM05	SM02	CAM01	BRA01	BRA03	CAM02	SM03	HAV01	HAV02	TAN02	CAM03
TAN01		0,0016	0,0116	0,2242	0,0007	0,0185	0,4404	< 0,0001	0,0031	0,0001	0,0038	0,006	0,0056	< 0,0001	< 0,0001	0,3984	0,3229
SM01	0,3107		0,1759	0,0665	0,9498	0,3528	0,0425	0,119	0,6186	0,7383	0,8082	0,3723	0,626	0,0294	0,506	0,0228	0,3569
JB01	0,6013	0,4824		0,3655	0,1213	0,7707	0,2299	0,0002	0,3584	0,0455	0,2916	0,6097	0,1499	< 0,0001	0,0058	0,1525	0,808
JB02	0,4604	0,7938	0,7035		0,0458	0,3149	0,7414	0,0003	0,1305	0,0191	0,1114	0,22	0,0654	< 0,0001	0,0043	0,698	0,811
BRA02	0,0204	0,2407	0,0245	0,1474		0,2927	0,0293	0,1103	0,5482	0,7746	0,7498	0,3018	0,6485	0,0243	0,5213	0,0134	0,3277
JB03	0,1135	0,6324	0,171	0,4509	0,4611		0,2048	0,0063	0,618	0,1659	0,5008	0,8927	0,2417	0,0008	0,0634	0,1477	0,7104
SM05	0,095	0,4802	0,1426	0,3431	0,7344	0,765		0,0003	0,0824	0,0126	0,0713	0,1385	0,0438	< 0,0001	0,0032	0,9843	0,6529
SM02	0,0002	0,0174	< 0,0001	0,0075	0,2297	0,0458	0,1681		0,0196	0,1711	0,0668	0,0032	0,5704	0,4405	0,2363	< 0,0001	0,0604
CAM01	0,0011	0,0446	0,0006	0,0218	0,4003	0,1072	0,2843	0,7273		0,3523	0,8167	0,6769	0,3881	0,0028	0,1663	0,0463	0,5118
BRA01	0,0021	0,0666	0,0014	0,0339	0,512	0,154	0,3618	0,582	0,8459		0,5485	0,1582	0,7834	0,0392	0,7306	0,0043	0,2488
BRA03	0,0769	0,4736	0,1131	0,328	0,6761	0,7817	0,9661	0,1166	0,2213	0,2941		0,5406	0,505	0,0145	0,3394	0,0427	0,4427
CAM02	0,0001	0,0137	< 0,0001	0,0056	0,2045	0,0369	0,1515	0,9691	0,6919	0,5458	0,1013		0,2549	0,0003	0,0475	0,0842	0,6484
SM03	0,0031	0,0304	0,0042	0,0184	0,1671	0,0598	0,125	0,5171	0,3948	0,3301	0,1018	0,527		0,3033	0,9335	0,0313	0,2464
HAV01	< 0,0001	0,0013	< 0,0001	0,0005	0,0332	0,0037	0,0297	0,292	0,1766	0,1222	0,015	0,2945	0,9971		0,0498	< 0,0001	0,0241
HAV02	< 0,0001	0,0016	< 0,0001	0,0005	0,049	0,0048	0,044	0,4468	0,2706	0,1872	0,0217	0,4544	0,8123	0,6824		0,0006	0,1747
TAN02	0,0016	0,0452	0,0012	0,0231	0,3645	0,1043	0,2614	0,8503	0,898	0,7579	0,2058	0,82	0,4598	0,2615	0,389		0,629
CAM03	0,0387	0,1564	0,0557	0,1135	0,4666	0,2487	0,3653	0,9297	0,7895	0,7108	0,335	0,9442	0,7051	0,6488	0,7891	0,8505	

2.3.2.3 Variação da área das manchas

A área com as manchas de cada macho das progênes foi medida e o valor total transformado em proporção em relação à área total dos olhos (Figura 8). Os dados foram tratados estatisticamente conforme descrito item 2.2.3 e os valores de p são mostrados na tabela 2. Entre as isolinhagens JB a área das manchas foi semelhante estatisticamente. Já entre as isolinhagens SM houve diferença na área das manchas entre SM01 e SM05 o $p= 0,0425$, SM05 e SM02 com $p= 0,0003$ e entre SM05 e SM03 com $p = 0,0438$. Quando comparadas as áreas das manchas entre as isolinhagens dos 2 pontos de coletas houve diferença entre JB02 e SM02 com $p= 0,0003$, JB03 e SM02 com $p= 0,0063$ e JB01 e SM02 com $p= 0,0002$. Agrupando a área das manchas de cada ponto de coleta a diferença estatística foi significativa dentro das isolinhagens JB e SM foi com $p = 0,0031$ e coeficiente de correlação $H=14,98$.

Uma tabela com os dados compilados foi gerada (Tabela 3). Para cada isolinhagem investigada foi descrita PMM e o número de machos F1, a mediana do número de manchas, a mediana da proporção da área das manchas o número de cópias por qPCR para algumas isolinhagens e o nível de atividade de *mariner* baseado no apêndice A. Há variação da PMM e número de cópias por qPCR entre as isolinhagens. Os números e área das manchas variam entre JB, SM e TAN. Dentro da maioria das isolinhagens ocorreram tamanhos de manchas de ambos tamanhos, grandes e pequenos (Figura 7).

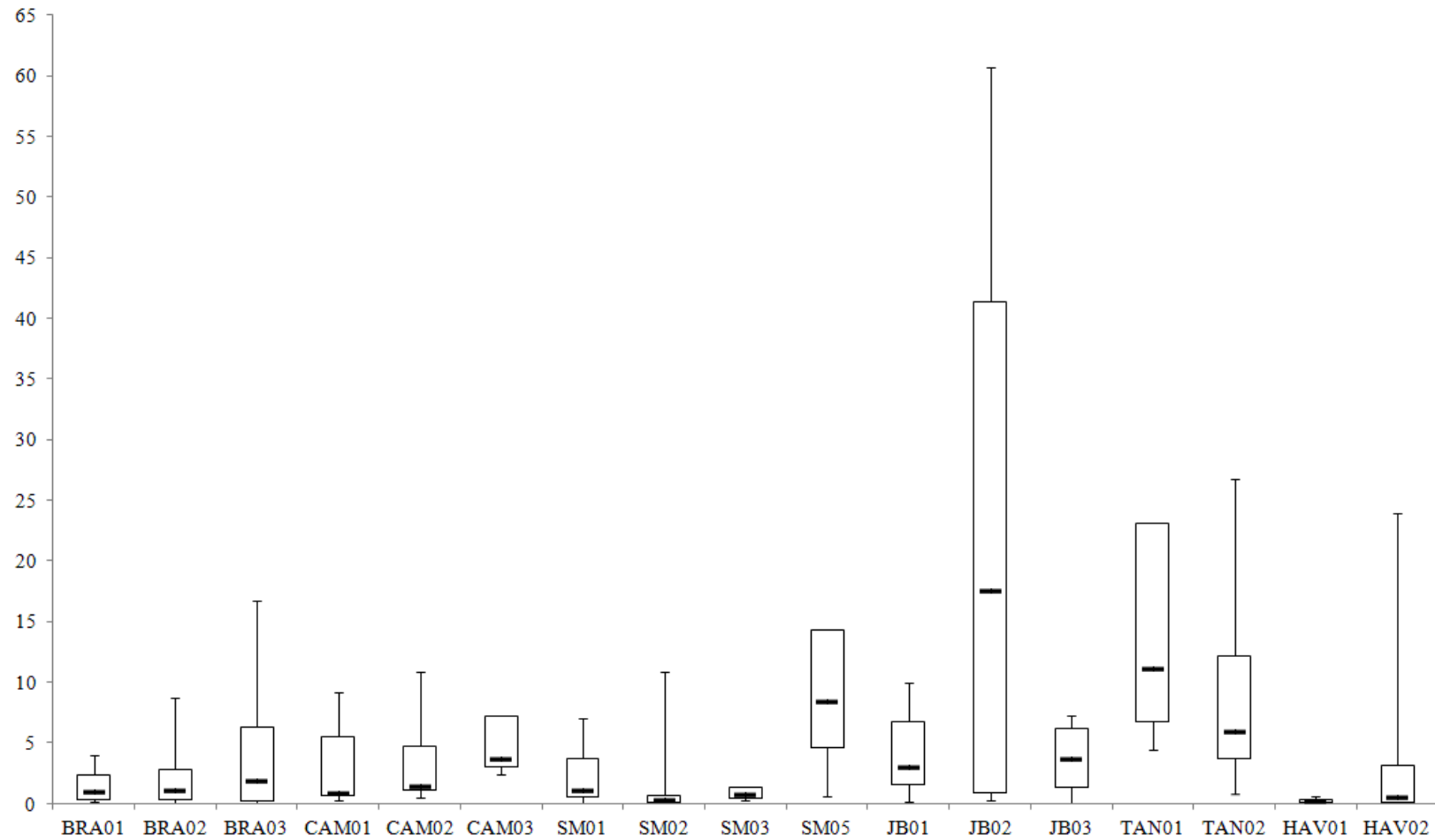


Figura 8 – Distribuição da proporção da área de manchas em todos os cruzamentos das isolinhagens. Barra preta representa a mediana do número de manchas e as barras de erros o número máximo e o mínimo de manchas representando a variação da área das manchas dos machos de cada isolinhagem. TAN, Tandil- Argentina; HAV, Estados Unidos- Havaí; SM, São Marcos- Santa Maria; JB, Jardim Botânico-Santa Maria; CAM, Campeche-SC; BRA, Brasília – DF.

Tabela 3 – Variáveis testadas em cada isolinhagem. PMM é a Proporção de Machos Mosaicos; N: número de machos nascidos na F1; Mediana do número de manchas; Mediana da proporção da área com manchas em relação a área total do olho; Número de cópias encontrado através da técnica de qPCR e nível de atividade, baseado no apêndice A.

Variáveis	PMM	N	Número de Manchas	Área das Manchas	Cópias por qPCR	Nível de atividade
<u>Isolinhagens</u>						
BRA01	28,9	66	3	0,90	35,35	Baixa atividade
BRA02	60	16	4	0,97	-	Baixa atividade
BRA03	24,3	36	4,5	1,76	4,87	Baixa atividade
CAM01	33,8	67	2,5	0,79	-	Baixa atividade
CAM02	20	106	2	1,40	100,47	Baixa atividade
CAM03	4,4	45	2	3,59	87,92	Baixa atividade
HAV01	16,8	106	1,5	0,12	-	Baixa atividade
HAV02	14,8	129	1	0,42	-	Baixa atividade
JB01	66,70	38	11	2,91	-	Baixa atividade
JB02	61,5	13	26	17,46	-	Muito alta atividade
JB03	56,3	13	6	3,63	19,64	Atividade moderada
SM01	72,7	11	10	1,02	-	Atividade moderada
SM02	42,3	29	2	0,19	-	Baixa atividade
SM03	19	20	1	0,69	-	Baixa atividade
SM04	0	35	-	-	-	Sem atividade
SM05	50	11	4,5	8,35	170,64	Baixa atividade
TAN01	81,8	12	13	11,03	-	Alta atividade
TAN02	10,2	88	2	5,87	7,67	Baixa atividade

Legenda: Baixa atividade: 1-5 manchas; Atividade moderada: 6-10 manchas; Alta atividade: 10-15 manchas; Muito alta atividade: mais de 15 manchas.

2.3.2.4 Quantificação relativa do número de cópias de *mariner* por qPCR

O número de cópias do elemento *mariner* foi estimado nas populações de *D. simulans* utilizando a técnica qPCR. Os valores do número de cópias de *mariner* das isolinhagens JB03, SM05, TAN02, CAM02, CAM03, BRA01 e BRA03 são mostrados na figura 8. Os valores encontrados são relativos e, provavelmente não representam o real número de cópias das isolinhagens. A estimativa do número de cópias da isolinhagem JB03 é de 19 cópias, SM05: 170 cópias, BRA01: 35 cópias, BRA03: 5 cópias, CAM02: 100 cópias, CAM03: 88 cópias e TAN02: 7 cópias.

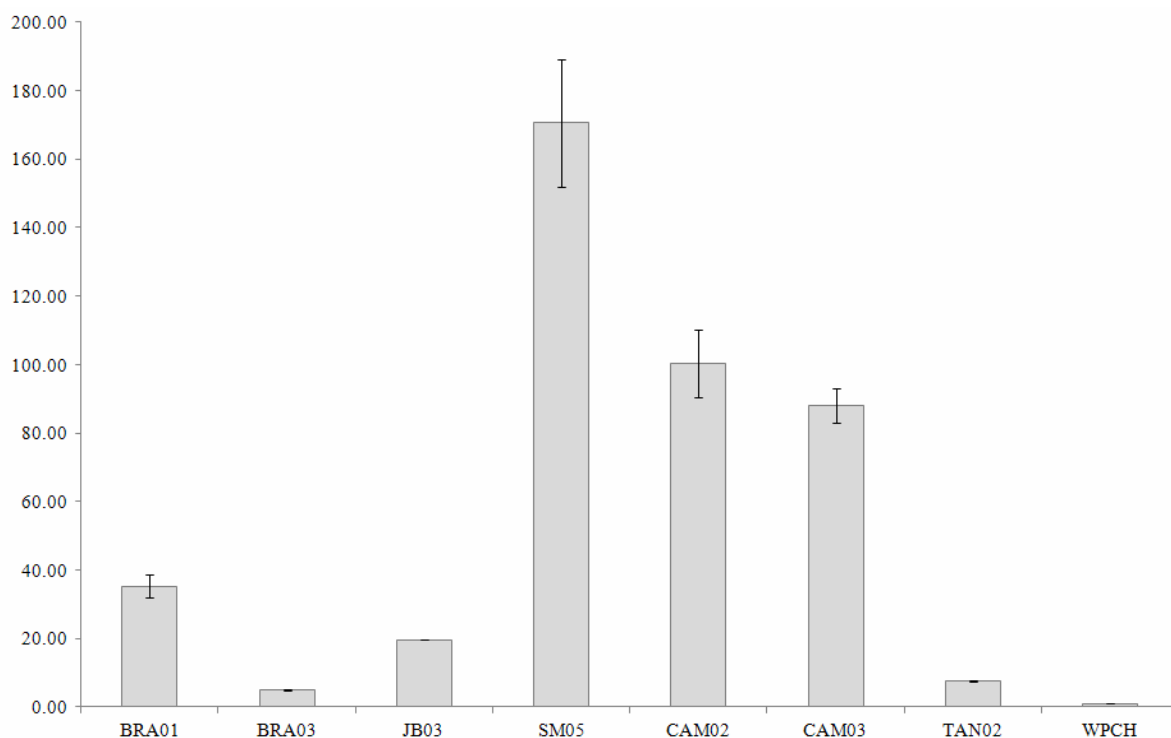


Figura 8 – Estimativa do número de cópias do elemento *mariner* obtida por qPCR. Barras de erro padrão.

2.4 Discussão

2.4.1 Parâmetros usados para avaliar a atividade de *mariner*

A atividade do elemento *mariner* foi analisada por diferentes parâmetros, como a PMM que fornece uma estimativa razoável da atividade, a contagem das manchas que estima quantos eventos de transposição ocorre por indivíduo e a área das manchas que indica em qual fase do desenvolvimento acontece a transposição (inicial ou tardia). A quantificação do número de cópias do elemento *mariner* por qPCR é uma medida indireta e ainda não bem padronizada mas forneceu uma ideia geral de quantas cópias há no genoma das isolinhagens estudadas.

Há registros de variações da atividade e número de cópias de *mariner* em populações naturais de *D. simulans* (CAPY *et al.*, 1990; CHAKRANI *et al.*, 1993; VIEIRA *et al.*, 1999). Apesar de essas variações terem sido estudadas entre as populações coletadas em diversos lugares do mundo (GIRAUD e CAPY, 1996; RUSSELL e WOODRUFF, 1999; PICOT *et al.*, 2008), as possíveis diferenças dentro de populações foram pouco avaliadas. A metodologia empregada, a PMM é muito generalista e não reflete a real atividade do transposon *mariner*.

As análises dos parâmetros apontam, de modo geral, para uma variabilidade da atividade tanto entre as isolinhagens das populações quanto entre os indivíduos de uma mesma isolinhagem.

A PMM segundo Russell e Woodruff (1999) reflete a atividade do elemento. De fato esta proporção mostra que há elementos ativos nas populações naturais promovendo a excisão de *mariner* inativo das linhagens de *D. simulans white-peach*, pois os machos, na maioria das vezes, nascem com os olhos pigmentados. Porém esta é uma medida generalista para a atividade e não fornece nenhuma informação mais detalhada quanto ao número de eventos de transposição e de cópias que estariam gerando as manchas.

Uma das hipóteses levantadas (Apêndice A) foi que a quantidade de manchas é informativa quanto ao número de eventos de transposição que revertem a mutação à condição selvagem de pigmentação. Quando os eventos de reversão ocorrem em estágios prematuros do desenvolvimento, poucas manchas surgem no adulto ou, provavelmente quando as reversões ocorrem em estágios mais tardios, poucas células voltarão à condição selvagem.

2.4.2 Avaliação da atividade de *mariner* durante o desenvolvimento

A área das manchas reflete em qual fase do desenvolvimento de *D. simulans white-peach* que ocorre transposição. Durante o desenvolvimento embrionário, primeiramente o embrião ou sincício é uma única célula com muitos núcleos idênticos. Após, estes núcleos migram para a periferia do citoplasma onde continuam a se dividir, nos ciclos que seguem tais células são separadas por membranas celulares formando uma camada única de células chamada de blastoderma celular (SNUSTAD e SIMMONS, 2008). É nesta fase que provavelmente ocorre a determinação celular, em que algumas dessas células são designadas para formar estruturas chamadas discos imaginais na fase larval e que posteriormente darão origem as partes do corpo do adulto (CHAN e GEHRING, 1971). A modelação do disco imaginal do olho inicia na transição do segundo instar larval para o terceiro, quando ocorre uma série de diferenciações. Estas diferenciações varrem todo o disco transformando-o em um mar de células indiferenciadas em linhas ordenadas. Estas células indiferenciadas formam *clusters* que são precursores das células dos omatídeos. As células de pigmentação são especificadas na fase de pupa (KUMAR, 2012). Assim se um evento de transposição ocorrer nas fases embrionárias iniciais, onde há poucas células, estas durante as próximas fases se dividirão e o efeito fenotípico observado no adulto será o de uma macha grande.

O tamanho da mancha indica em que fase do desenvolvimento ocorreu a transposição e, possivelmente, cada mancha seja um único evento de transposição.

O surgimento de manchas grandes foi constatado no experimento de troca de temperatura em que 17% do total de machos mosaicos apresentaram manchas grandes quando a fase de embrião foi submetida à alta temperatura. Porém mais de uma mancha e com diferentes tamanhos foi observada num mesmo macho adulto, confirmando que o processo de transposição pode ocorrer ao longo de todo o desenvolvimento (Figura 7).

As manchas menores com 1 a 2 omatídeos pigmentados indicam que a fase do desenvolvimento que provavelmente ocorreu transposição é mais tardia. Isto pode ser evidenciado no experimento de troca de temperatura onde a proporção de machos da Classe 1 foi de 20% no 3º instar larval e 11% na fase de pupa (Figura 4).

2.4.3 Número e área das manchas

Quando observamos somente a PMM, há evidente variação entre as isolinhagens de um mesmo local e de locais diferentes. As isolinhagens apresentaram muitos machos expressando *mariner* e também poucos machos com manchas. Esta variação pode ser observada em Brasília, Campeche e Tandil (Figura 5) mesmo as isolinhagens tendo sido elaboradas a partir de uma mesma população mantida no laboratório. Em Capy *et al.*, (1990) as populações estudadas apresentaram uma alta variabilidade na expressão fenotípica medida pela PMM, e um contínuo de classes de mosaicismos pôde ser estabelecido.

Considerando os dados do número e área das manchas apresentados nas Figuras 6 e 8, os gráficos parecem que se sobrepõe na maioria das isolinhagens. Naquelas com poucas manchas a variação da proporção da área também foi menor e naquelas em que há muitas manchas a variação da área foi maior. Entretanto, a área apresentada é um somatório de áreas das manchas de um macho e quando analisadas mais detalhadamente em cada macho (Tabela 3), há manchas de ambos os tamanhos, grandes e pequenas evidenciando que a mobilização de *mariner* pode ocorrer em todas as fases do desenvolvimento nas isolinhagens estudadas.

Se o número de manchas é levado em conta para a quantificação da atividade de *mariner*, as isolinhagens das populações mantidas em laboratório não apresentaram grandes diferenças entre si. Já as isolinhagens recentemente coletadas, JB e SM, juntamente com Tandil, apresentaram variação. Há evidências de que a combinação de um longo tempo de manutenção em laboratório e reduzido tamanho populacional podem estabilizar a atividade de *mariner* de populações naturais (GIRAUD e CAPY, 1996; RUSSELL e WOODRUFF, 1999).

Entretanto, as análises de variância mostram que a semelhança no número e área das manchas das isolinhagens das populações de Brasília, Campeche e Tandil mantidas no laboratório, não são significativamente diferentes entre si, a população de Haváí apresentou diferenças, mas fracamente suportada. Esta similaridade não é seguida pelas isolinhagens de São Marcos que apresentou uma diferença significativa no número e área das manchas entre as isolinhagens (Tabela 2). As variações registradas em algumas isolinhagens e não em outras confere um cenário sem um padrão geral para a atividade do elemento. Sistemas de regulação do hospedeiro ou do transposon podem estar ocorrendo dentro das populações tanto de laboratório quanto as recentemente coletadas.

2.4.4 Número de cópias e regulação de *mariner*

A análise molecular revelou de modo geral, uma alta quantidade de cópias nas isolinhagens testadas. Se o número de manchas for considerado como medida da atividade de *mariner*, não há correspondência desses valores com a quantidade baixa de manchas apresentada pelas isolinhagens (Tabela 3). Esta diferença é observada entre as isolinhagens de BRA01 e BRA03.

A atividade do elemento *mariner* das populações naturais pode variar de acordo com a própria seqüência e posição genômica (CAPY *et al.*, 1992; MARUYAMA e HARTL, 1991; MEDHORA *et al.*, 1991). Diferenças no número de manchas, de cópias e na taxa de excisão também podem ser devidas a um único elemento altamente ativo ou por vários elementos com baixa atividade (CHAKRANI *et al.*, 1993).

As diferenças na quantidade de cópias poderiam ser explicadas pelo fato de que em espécies com TEs recém introduzidos em células germinativas, se transpõem sem impedimentos, extrapolando o número de cópias. Os danos causados nos cromossomos são tantos que eles são eliminados pela seleção natural. Eventualmente um equilíbrio é alcançado onde o ganho de novos TEs é compensado por sua perda através da seleção natural (HARTL *et al.*, 1997). Este é um cenário possível, entretanto o número de cópias foi alto em algumas isolinhagens. CAM02 e CAM03 apresentaram quantidade de cópias elevadas, sendo que a PMM foi heterogênea. Em CAM03 dos 45 machos que nasceram, apenas 4,4% continham manchas. Poucos machos expressam a característica, sendo que o genoma contém 88. O alto número de cópias de algumas isolinhagens e a baixa atividade representada pela quantidade de manchas e PMM pode ser explicado por alguns mecanismos de regulação os quais são plausíveis de ocorrer com o elemento *mariner*.

Um mecanismo de auto-regulação já foi observado em *Mos1* e semelhantemente no elemento *Sleeping Beauty* da superfamília TC1-*mariner*. A produção da transposase ocorre em altos níveis, seja por aumento da dosagem do gene ou por aumento na expressão de um único gene. Este fenômeno é conhecido como inibição da superprodução. As interações pós traducionais entre as subunidades das transposases diminuem a atividade da enzima (HARTL *et al.*, 1997; IVICS *et al.*, 2004).

Outro mecanismo que reduziria a transposição de *mariner*, sem diminuir as cópias já existentes no genoma seria a regulação por RNA de interferência, ou RNAi. Os RNAi são uma classe que usam curtos RNAs para manipular ácidos nucléicos. Uma das suas funções é

agir como mecanismo de defesa contra os efeitos potencialmente prejudiciais de TEs ativos (OBBARD *et al.*, 2009). Um TE epigeneticamente inativo mantém o potencial de codificação para mobilizar-se, mas não produzem as proteínas necessárias devido a um ambiente repressivo da cromatina. Pequenos RNAi podem iniciar o silenciamento pós-transcricional dos TEs. A própria estrutura de repetição invertida dos transposons de DNA pode formar *hairpin* através da transcrição de todo o elemento iniciando a partir de promotores externos (SLOTKIN e MARTIENSSSEN, 2007). Tal transcrição completa foi encontrada em *Caenorhabditis elegans* para o transposon TC1, e isso foi proposto ser o processo que inicia a produção de pequenos RNAi de repetições terminais invertidas de TC1 (SIJEN e PLASTERK, 2003). Tais mecanismos de regulação devem ser melhor investigados.

2.5 Conclusão

Nossas análises revelaram que o tamanho das manchas é uma medida eficaz para estimar em qual fase do desenvolvimento o elemento *mariner* inicia sua expressão. A fase de embrião apresentou as maiores manchas no experimento de troca de temperatura. Manchas grandes indicam que a excisão de *mariner* ocorreu nas fases iniciais do desenvolvimento. Os cruzamentos entre as isolinhagens de populações naturais e a linhagem de *D. simulans white-peach*, a maioria dos machos da F1 apresentou tamanhos de manchas variados, grandes e pequenos, evidenciando que nas isolinhagens investigadas a transposição pode ocorrer nas diferentes fases do desenvolvimento.

O parâmetro usado até o momento por trabalhos que estimaram um nível de atividade do elemento *mariner* pela proporção de machos mosaicos, fornece apenas uma estimativa razoável da atividade. A classificação usada para estabelecer a proporção já foi diagnosticada como sendo imprecisa e um novo método de quantificação da atividade foi proposto.

O número de manchas representa quantos eventos de transposição ocorreram durante o desenvolvimento do olho, gerando um efeito fenotípico que é observado nos machos adultos. Neste trabalho evidenciamos que populações mantidas em laboratório e recentemente coletadas na natureza, de modo geral, apresentam variação na atividade do elemento dentro de uma mesma população e entre as populações. As análises estatísticas do número e área das manchas da maioria das isolinhagens registraram semelhanças nas variâncias, porém, houve

grandes variações quando foi observado o número de cópias por qPCR, e a quantidade de machos que expressaram o elemento *mariner*.

As diferenças no número de manchas, de cópias e na taxa de excisão encontradas no nosso trabalho podem ser devidas a um único elemento altamente ativo ou por vários elementos com baixa atividade (CHAKRANI *et al*, 1993). São necessárias análises adicionais que investiguem quantas cópias realmente estão ativas no genoma das linhagens e quais mecanismos de regulação poderiam estar inibindo a mobilização das cópias encontradas.

REFERÊNCIAS

AUGÉ-GOUILLOU, C., et al. Assembly of the *mariner* Mos1 synaptic complex. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, n. 7, p. 2861–2870. 2005.

BÄCHLI, G. **Taxodros**: The database on taxonomy of Drosophilidae, v. 1, 03. Database 2008/01. Disponível em < <http://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: 8 dezembro. 2011.

BELYAYEV, A. et al. Transposable elements in a marginal plant population: temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat. **Mobile DNA**. v. 1, n. 6, p. 1-16. 2010.

BIÉMONT, C. et al. Transposable elements and genome evolution: the case of *Drosophila simulans*. **Genetica**. v. 107, p. 113-120. 1999.

BIÉMONT, C., et al. Worldwide distribution of transposable element copy number in natural populations of *Drosophila simulans*. **Evolution**. v. 57, p. 159–167. 2003.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**. v. 443, p. 4421-4424. 2006.

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

BRUNET, F. et al. Phylogenetic analysis of *Mos1*-like transposable elements in the Drosophilidae. **Journal of Molecular Evolution**. v. 49, p. 760-768. 1999.

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

CAPY, P. Sequence analysis of active *mariner* elements in natural populations of *Drosophila simulans*. **Genetics**. v. 150, p. 499-506. 1992.

CAPY, P. et al. Active *mariner* transposable elements are widespread in natural populations of *Drosophila simulans*. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 242, p. 57-60. 1990.

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

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

CHAKRANI, F.; CAPY, P.; DAVID, J. R. Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. **Genetics Selection Evolution**. v. 25, p. 121-132. 1993.

CHAN, L-N; GEHRING, W. Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 9, p. 2217-2221. 1971.

CORDAUX, R., et al. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase from a mobile element. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 8101-8106. 2006.

DAVID, J.R. et al. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. **Heredity**. v. 94, p. 3–12. 2005.

DEPRÁ, M. et al. The *hobo* transposon and *hobo*-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila*. **Gene**. v. 448, p. 57–63. 2009.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368. 2007.

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

GARZA, D. et al. Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. v. 128, p. 303-310. 1991.

GIRAUD, T.; CAPY, P. Somatic activity of *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. . **Proceedings of the Royal Society B**. v. 263, p. 1481-1486. 1996.

HARTL, D. L.; LOHE, A. R.; LOZOVSKAYA, E. R. Modern thoughts on an ancient *marinere*: function, evolution, regulation. **Annual Review of Genetics**. v. 31, p. 337–58. 1997.

HARTL, D. L. Discovery of the transposable element *mariner*. **Genetics**. v. 157, p. 471–476. 2001.

IVICS, Z., et al. The *Sleeping Beauty* transposable element: evolution, regulation and genetic applications. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 6, p. 43-56. 2004.

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

JACOBSON, J.W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D.L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 83, p. 8684-8688. 1986.

JARDIM, S. S.; LORETO, E.L.S. Comparative methodologies for estimating *mariner* activity using *white-peach* assay in *Drosophila simulans*. **Drosophila Service Information**. v. 94. p. 129-132. 2011.

KAZAZIAN, Jr. H.H. Mobile Elements: drivers of genome evolution. **Science**. v. 303, p. 1626-1632. 2004.

KEELING, P. J.; PALMER, J. D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. **Nature Reviews: Genetics**. v. 9, p. 606-618. 2008.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 7701-7711. 1997.

KUMAR, J. P. Building an ommatidium one cell at a time. **Developmental Dynamics**. v. 241, p. 136–149. 2012.

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

LAMPE, D. J. et al. Recent horizontal transfer of *mellifera* subfamily *mariner* transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. **Molecular Biology and Evolution**. v. 20, p. 554-562. 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} method. **Methods**. v. 25 p. 402–408. 2001.

LOHE, A.R. et al. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of *mariner*-like transposable elements. **Molecular Biology and Evolution**. v. 12, p. 62-72. 1995.

LOHE, A.R.; HARTL., D.L. Autoregulation of *mariner* transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation. **Molecular Biology and Evolution**. v. 13, p. 549-555. 1996.

LOCKTON, S.; ROSS-IBARRA, J.; GAUT, B. S. Demography and weak selection drive patterns of transposable element diversity in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, n. 37, p. 13965–13970. 2008.

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

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

MEDHORA, M.M.; MACPEEK, A.H.; HARTL, D.L. Excision of the *Drosophila* transposable element *mariner*: identification and characterization of the *Mos* factor. **European Molecular Biology Organization**. v. 7, p. 2185-2189. 1988.

NOWACKI, M., et al. A Functional Role for Transposases in a Large Eukaryotic. **Genome Science**. v. 324, p. 935-938. 2009.

OBBARD, D. J., et al. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 364, p. 99-115. 2009.

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

PICOT, S., et al. The *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. **Heredity**. v. 101, p. 1-7. 2008.

PLASTERK, R.H.A.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z. Resident Aliens the Tc1/*mariner* superfamily of transposable elements. **Trends in Genetics**. v. 15, n. 8, p. 326-332. 1999.

PRITHAM, E.J. Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. **J Heredity**. v. 100, n. 5, p. 648-655. 2009.

ROUAULT, J-D., et al. Automatic classification within families of transposable elements: Application to the *mariner* family. **Gene**. v. 448, n. 2, p. 227-232. 2009.

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

SASAKURA, Y. et al. Excision and transposition activity of Tc1/*mariner* superfamily transposons in sea urchin embryos. **Zoological Science**. v. 27. p. 256-262. 2010.

SIJEN, T.; PLASTERK, R. H. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. **Nature**. v. 426, p. 310-314. 2003.

SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews**. v. 8, p. 272-285. 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. ed. 4, p. 552. 2008.

STEINER, C. G. **A variabilidade populacional do elemento de transposição *mariner* na espécie *Drosophila simulans* e sua descoberta em *Drosophila melanogaster***. 2002. 49 f. Dissertação. (Mestrado em Biodiversidade Animal)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

THROCKMORTON, L.H. The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King RC (ed) **Handbook of genetics**. v. 3: Invertebrates of genetic interest. Plenum, New York, pp 421-469. 1975.

VIEIRA, C. et al. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Molecular Biology and Evolution**. v. 16, n. 9, p. 1251-1255. 1999.

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

WALLAU, G. L. et al. The evolutionary history of *mariner*-like elements in Neotropical Drosophilids. **Genetica**. v. 139, n. 3, p. 327-338. 2011.

WICKER, T., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Review Genetics.**, v. 8, p. 973-982. 2007.

YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M. Phylogeny and evolution of diptera: recent insights and new perspectives. In: Yeates, D.K.; Wiegmann, B. M. (eds) **The evolutionary biology of flies**. Columbia University Press, New York. pp. 14-44. 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Comparative methodologies for estimating *mariner* activity using *white-peach* assay in *Drosophila simulans*

Jardim, S. S., and Loreto, E.L.S. PPG Biodiversidade Animal, Biology dep. UFSM, Brazil. sinarajardim@gmail.com

Introduction

Transposable elements are DNA segments that can be mobilized within and among genomes. These elements have been pointed out as having great impact on the host genomes evolution by their capacity to insertion into coding or regulatory regions and inducing chromosome rearrangements (Giraud and Capy, 1996; Biémont and Vieira, 2006; Feschotte and Pritham, 2007).

The transposable element *mariner* is an originally discovered into the promoter region of *white* gene of *D. mauritiana* causing an attenuated colorless eye phenotype: this mutant has *white-peach* color eyes (Jacobson and Hartl, 1985; Jacobson *et al.*, 1986). That original *mariner* element, called *wpch* (short term for *white-peach*), is an inactive copy and it is not able to mobilize itself. Posteriorly, it was experimentally transferred to *mariner*-free strains of *D. simulans* and *D. melanogaster* (Garza *et al.*, 1991; Bryan *et al.*, 1990). The *D. simulans* *wpch* strain, containing a *wpch* mutation, does not show evidences of excision in somatic cells or germline because only this inactive *mariner* copy is present in the genome (Hartl, 2001). In presence of an autonomous *mariner* copy which could provide the transposase enzyme, the nonautonomous *wpch* element can be removed out from *white* gene promoter causing reversion of mutation to wild condition in some cells, generating a mosaic pattern of eye pigmentation (Lohe and Hartl, 1996).

Once a transposase source can be provided by crossing these *wpch* mutants with flies carrying potentially active copies of *mariner*, the extend of mosaic formation can be utilized for quantification of *mariner* transposition activity (Capy *et al.*, 1990; Bryan *et al.*, 1990; Woodruff and Thompson, 2001; Picot *et al.*, 2008). This method has been used to describe latitudinal clines of *mariner* transposition activity in *D. simulans* natural population (Giraud and Capy, 1996; Russell and Woodruff, 1999; Picot *et al.*, 2008). In general, these studies use the percentage of mosaic males (PMM) observed in the F1 of crosses between *wpch* female and males of strains to be tested.

Another system for quantification of transposable activity has been proposed. It uses a predefined categorization where the number and size of red-color spots are considered and

flies are classified into a determined category (Figure 1). As larger is the red area in mosaic eyes, more active the *mariner* elements from testing strains are considered to be (Giraud and Capy, 1996; Bryan *et al.*, 1990; Medhora *et al.*, 1988; Hartl, 1989). However, this classification has been done only by visual inspection and can result in imprecise quantification of area affected by reversions. Other aspect to be considered is that spot size may reflect the moment of reversion during the eye development more than the degree of activity from certain *mariner* element. When an event of *wpch* excision takes place in early developmental stages within a single cell, many other cells will be produced from that reverting cell, forming a great spot (Haymer and Marsh, 1986). Flies bearing those great spots are classified by the pattern methodology as high activity, but in fact may result from only transposition event.

The objective of this study was to compare methodologies used to estimate the *mariner* activity in *wpch* assays using: i) predefined classes; ii) total red area in the mosaic eyes; iii) number of red spots. Additionally, the effect of temperature was evaluated in generating the mosaic eye pattern.

Materials and methods

For testing, in study we used *D. simulans* strains (wild phenotype) collected in Brasília (15o44'47''S; 47o 55' 47''O; Brazil) as transposase source, besides of *D. simulans wpch* lineage. Crosses were performed among 10 males (wild phenotype) and 10 females *D. simulans (wpch* phenotype) and three temperatures were analyzed. After crossing, vials were stored at 14°C, 20°C or 28°C until F1 emergence. 8, 25 and 29 replicas for 14°C, 20°C and 28°C were done. In F1 generation males carrying *wpch* mutation are expected to show mosaic eyes (Jacobson and Hartl, 1985). The rate of mosaic males formation was evaluated (for PMM analysis) and the mosaic flies were classified into the categories showed in the Figure 1. Also, both eyes of each mosaic male were photographed and the total area occupied by red spots was measured using the software Image Manipulation Program – GIMP 2.6.7. In addition, the number of red spots was also quantified.

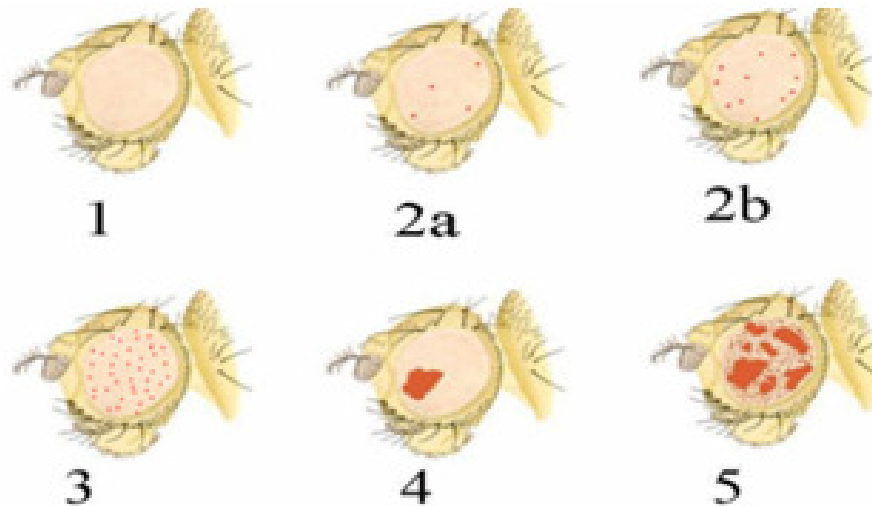


Figure 1 – Classification of mosaics males according standard methodology in six categories.

Results and discussion

The PMM observed at the analyzed temperatures was: 20.88% at 14°C, 61.47% at 20°C and 66.96% at 28°C. These results agree with other previous studies that showed the influence of temperature in the rate of *mariner* transposable element transposition (Giraud and Capy, 1996; Russell and Woodruff, 1999; Picot *et al.*, 2008). Once high transposition rate occurs in higher temperature, as confirmed by our temperature test assay, all other experiments were performed at 28° C. Every male fly emerged from crossing experiments was classified into one of six categories using the pattern system showed in the Figure 1. Alternatively, the entire red pigmented area was measured for both eyes. As showed in the Figure 2, the standard deviation observed for the pigmented area among classes encompasses the average observed in all categories. These findings show that the use of conventional mosaic categories is not totally effective for quantifying the *mariner* activity in *wpch* crossing assay, once the classes form a continuous. Besides which, the major critics to both methodologies either the visual classification using the mosaic pattern or the measurement of pigmented area is that the size of spots is seriously affected by the moment of *mariner* excision during fly development.

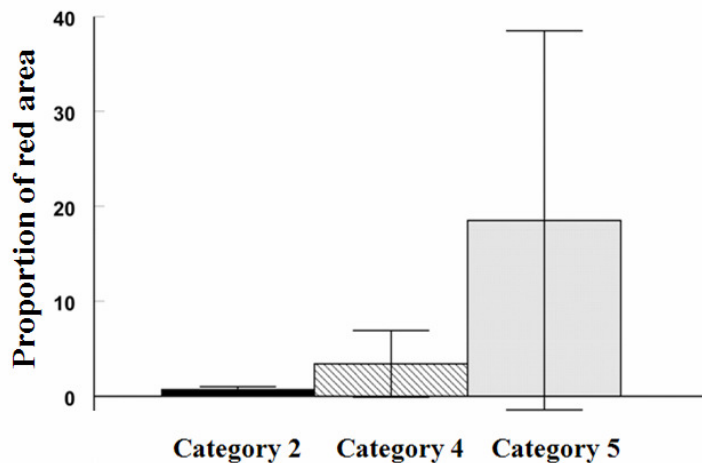


Figure 2 – Proportion of red area in mosaic eyes classified in three categories based in pattern methodology, at 28°C.

An alternative method for quantification of transposition rate was done by counting the number of red spots and comparing it with the standard categorization analysis. The dates show that the spot number is more accurate for quantification of transposition activity than area analyzes, it because the variation in spot number within categories is relatively smaller than red size area (Fig 3).

We propose that *mariner* transposable activity can be classified into 4 categories using the number of spots in both eyes. Flies with 1 to 5 spots are classified as low activity. Flies with 6 to 10 spots are classified as moderate activity. Flies with 10 to 15 spots are classified as high activity and, finally flies with more the 15 spots are classified as very high activity. A similar classification was proposed by Capy *et al.* (1990).

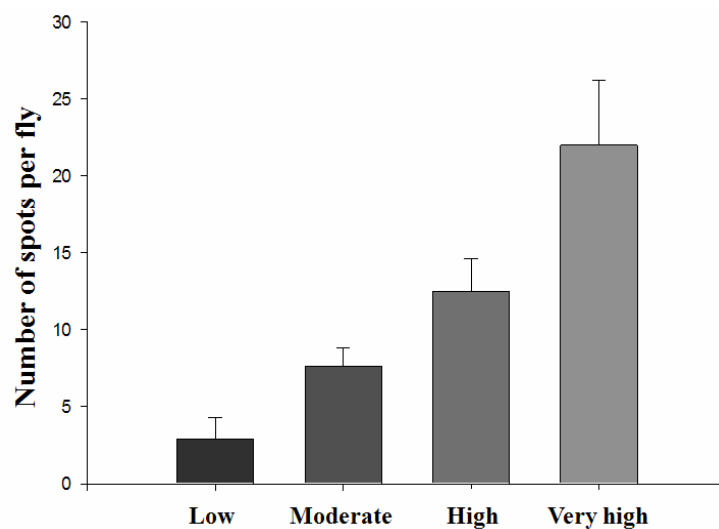


Figure 3 – Average number of spots according the four classes proposed by the new methodology.

When the reversion of *wpch* mutation occurs in developmental early stages, few spots appear, but they form a large pigmented area. When the reversion occur in later stages, few cells back to wild condition per reversion event, given origin the small spots (Giraud and Capy, 1996; Bryan and Hartl, 1988; Hartl, 1989). Thus, the number of spots reflects more accurately the transposable activity level of the element, allowing a more detailed understanding of their behavior.

Biémont, C., and C. Vieira 2006, *Nature* 443: 4421-4424; Bryan, G., D. Garza, and D. L. Hartl 1990, *Genetics* 125: 103-114; Bryan G., and D.L. Hartl 1988, *Science* 240: 215–217; Capy, P., F. Chakrani, F. Lemeunier, D.L. Hartl, and J.R David 1990, *Proc. R. Soc. Lond. B* 242: 57-60; Feschotte, C., and E.J. Pritham 2007, *Annu Rev of Genet* 41: 331-368; Garza, D., M. Medhora, A. Koga, and D.L. Hartl 1991, *Genetics* 128: 303-310; Giraud, T., and P. Capy 1996, *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 1481-1486; Hartl, D.L. 1989, Transposable element *mariner* in *Drosophila* species. In: *Mobile DNA* (Berg, D.E., and M.M. Howe, eds.). pp. 531-536. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; Hartl, D. L., 2001, *Genetics* 157: 471–476; Haymer, D.S., and J.L. Marsh 1986, *Develop. Genet.* 6: 281-191; Jacobson, J.W., and D.L. Hartl 1985, *Genetics* 111: 57-65; Jacobson, J.W., M.M. Medhora, and D.L. Hartl 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8684-8688; Lohe, A.R., and D.L. Hartl 1996, *Mol. Biol. Evol.* 13: 549-555; Medhora, M.M., A.H. MacPeck, and D.L. Hartl 1988, *EMBO* 7: 2185-2189; Medhora, M., K. Maruyama, and D. L. Hartl 1991, *Genetics* 128: 311-318; Picot, S., G.L. Wallau, E.L.S. Loreto, F.O. Heredia, A. Hua-Van, and P. Capy 2008, *Heredity* 101: 1-7; Russell, A.L., and R.C. Woodruff 1999, *Genetica* 105: 149-164; Woodruff, R.C., and J. N. Thompson, jr. 2001, *Dros. Inf. Serv.* 84: 213-215;